ISSN 0025-7680

MEDICINA

BUENOS AIRES

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

ARTICULOS ORIGINALES

CASUISTICAS

REUNION ANATOMOCLINICA

ARTICULOS ESPECIALES

EDITORIALES

CARTAS AL COMITE DE REDACCION

★ En inglés

VOL. 41, Nº 1 1981

EMINA

los más altos índices de eficacia

en
pesadez
de piernas
93%

en
várices del
embarazo
93%

en el
síndrome
ortostático
91%

en
insuficiencia
venosa
crónica
87%

Elaborado por
Johnson & Johnson
de Argentina S.A. Comercial e Industrial
Darwin 471 - Buenos Aires

MEDICINA

BUENOS AIRES

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

ORIGINAL ARTICLES

CASE REPORTS

CLINOCOPATHOLOGICAL CONFERENCE

SPECIAL ARTICLES

EDITORIALS

LETTERS TO THE EDITOR

★ **In english**

VOL. 41, Nº 1 **1981**

NUEVO!

VELOCEF

Cefradina Squibb

1 GRAMO

COMPRIMIDOS

Primera cefalosporina **ORAL** en **ALTAS DOSIS**

SQUIBB

Más de un siglo de experiencia inspira confianza

PRESENTACIONES

CAPSULAS "250 mg": Envases con 8 y 16.
CAPSULAS "500 mg": Envases con 8 y 16.
COMPRIMIDOS "1 g": Envases con 8.
INYECTABLES: Frascos-ampolla con 250 mg, 500 mg y 1.000 mg.

activa la digestión lenta

Los más altos índices de eficacia en trastornos digestivos de origen funcional u orgánico:

Distensión abdominal, sensación de plenitud, dolor epigástrico, eructos/aerofagia, pirosis/acidez, regurgitación, náuseas/vómitos, mejoran significativamente con Motilium.

Libre de reacciones adversas:

Por disociación de acciones central y gastrocinética. Motilium está libre de cualquier efecto neurológico central. Muy bien tolerado, inclusive mejora la tolerancia a otras medicaciones.

Dosificación:

Síntomas de dispepsia: Un comprimido o 30 gotas (1 ml) 3 veces por día, 15 a 30 minutos antes de las comidas.

Dispepsia asociada con nauseas y/o vomitos: Dos comprimidos o 60 gotas (2 ml) 3 a 4 veces por día.

MARCA DE FABRICA

Motilium

JANSSEN

gastrocinético

información para la prescripción

Definición: La sustancia activa de Motilium es Domperidone (R 33812), una síntesis original de los Laboratorios de Investigación de Janssen Pharmaceutica de Bélgica.

Propiedades: Motilium normaliza la motilidad y el vaciamiento gástrico, careciendo de efectos colaterales, neurológicos o psicotrópicos.

Indicaciones: Trastornos relacionados con una evacuación gástrica deficiente, tales como: distensión abdominal, sensación de plenitud después de las comidas, incapacidad para terminar una comida normal, dolor epigástrico, aerofagia/eructos, pirosis/acidez, regurgitación, náuseas/vómitos y patología funcional pediátrica.

Posología y administración:

Dispepsia

Adultos: Un comprimido o 30 gotas (1ml) 3 veces por día, 15 a 30 minutos antes de las comidas.

Niños: Una gota (0,3 mg) por kilo de peso 3 veces por día, 15 a 30 minutos antes de las comidas.

Dispepsia asociada con náuseas y/o vómitos

Adultos: Dos comprimidos o 60 gotas (2 ml), 3 a 4 veces por día.

Niños: Una gota (0,3 mg) por kilogramo de peso 3 a 4 veces por día.

Ante intolerancia oral o cuadro agudo:
0,1 mg/kilogramo de peso, por vía intramuscular o intravenosa de 1 a 6 veces por día.

Observaciones: Se aconseja diluir las gotas en algún líquido mezclando bien antes de la administración.

Contraindicaciones: La ausencia de efectos colaterales neurológicos con Motilium es debido al hecho de la casi nula penetración de la droga en la barrera hematoencefálica.
Sin embargo, dado que en los primeros meses de vida las funciones metabólicas y las funciones de la barrera hematoencefálica no están totalmente desarrolladas, la aparición de efectos neurológicos no puede estar totalmente excluida en niños menores de 1 año, por lo que no se aconseja su uso en dicho grupo etario.
A pesar de no haberse observado efectos teratogénicos o embriotóxicos en estudios con animales, se contraindica el uso de Motilium en mujeres embarazadas.

Presentaciones:
Comprimidos: Estuches conteniendo 20 y 40 comprimidos con 10 mg de Domperidone cada uno.
Gotas al 1%: Frasco gotero conteniendo 20 ml con 10 mg de Domperidone/ml (0,3 mg por gota).
Ampollas: Estuche conteniendo 5 ampollas de 2 ml (5 mg de Domperidone/ml).

Producido bajo licencia de
JANSSEN PHARMACEUTICA n.v.
Beerse, Bélgica

Elaborado por
Johnson & Johnson
de Argentina S.A. Comercial e Industrial
Darwin 471 - Buenos Aires

Los efectos secundarios de la mayoría de los agentes antihipertensivos, modifican los hábitos de vida de los hipertensos especialmente cuando se trata de pacientes jóvenes.

Minipres* 1 mg / 2 mg

Prazosin ClH

Una vida mejor para su paciente hipertenso...

- Reduce la resistencia periférica elevada a través de una vasodilatación arteriolar.
- Este mecanismo de acción permite un eficaz control de la hipertensión arterial con mínima incidencia de efectos colaterales.
- Su acción vasodilatadora arteriolar permite la combinación con betabloqueantes y/o tiazidas mejorando la respuesta anterior, permitiendo la administración de dosis menores y una más baja incidencia de efectos secundarios.

* Marca de PFIZER INC.

DOSIFICACION: Inicial: 0,5 mg 2 ó 3 veces por día durante la primera semana. Luego aumentar progresivamente la dosis diaria en base a la respuesta de la presión arterial del enfermo. **Habitual:** 3 a 6 mg diarios. Puede suministrarse en dos o tres tomas diarias. **Máxima:** 20 mg diarios. **PRESENTACIONES:** MINIPRES* de 1 y 2 mg en envases con 30 y 100 comprimidos ranurados.

CONTRAINDICACIONES: MINIPRES* está contraindicado en pacientes con sensibilidad conocida hacia esta droga. **ADVERTENCIAS:** Aunque no se han observado efectos teratogénicos en estudios realizados en animales la inocuidad de prazosin durante el embarazo no ha sido establecida. Por lo tanto, sólo debe usarse durante el embarazo cuando a criterio del médico el beneficio potencial supere los riesgos posibles. **PRECAUCIONES:** Un reducido porcentaje de pacientes puede responder más rápidamente y en forma más importante que la mayoría. En algunos casos esto ha producido pérdidas repentinas del conocimiento que generalmente duran unos pocos minutos, aunque han llegado a prolongarse hasta una hora. En casi todos los casos esta respuesta ocurre entre los 30-90 minutos después de recibir la dosis inicial y está asociada con síntomas premonitorios como mareos, debilidad y sudoración. Aun cuando tal respuesta ocurra, el tratamiento posterior puede ser satisfactorio. Esta reacción exagerada parece estar en relación con la dosis administrada y no con la severidad de la hipertensión. La experiencia clínica recogida hasta el momento indica que la incidencia y severidad de síntomas tempranos de hipotensión pueden ser reducidos mediante una dosis inicial baja, que se irá incrementando con precaución durante la primera y segunda semanas de tratamiento. Como es habitual en la práctica al utilizar agentes hipotensores efectivos, el paciente deberá ser advertido sobre cómo evitar los síntomas debidos a hipotensión ortostática y cuáles deben ser las medidas que se tendrán en cuenta si ellos aparecieren. El paciente deberá ser prevenido para evitar situaciones de las que pudiera resultar dañado a causa de mareos o desvanecimientos durante la iniciación del tratamiento con **MINIPRES***. **REACCIONES ADVERSAS:** Las reacciones más comunes asociadas al tratamiento con **MINIPRES*** son mareos, dolor de cabeza, somnolencia, decaimiento, debilidad, náuseas y palpitaciones. En la generalidad de los casos, los efectos colaterales han desaparecido con la continuación del tratamiento o han sido tolerados sin requerir disminución de dosis.

Pfizer

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 1-5 (1981)

ROTAVIRUS EN NIÑOS CON GASTROENTERITIS AGUDA

A. ROSETO, D. STAMBOULIAN, CARLOTA RUSS, G. LOMBARDI, J. CERVETTO, R. LICASTRO, J. G. BARRERA ORO

Departamento de Pediatría, Hospital Nacional A. Posadas, Haedo, y Departamento de Virología, Instituto de Microbiología Carlos A. Malbrán, Buenos Aires

Recientes y numerosos estudios realizados en varias partes del mundo sugieren que los *reovirus-like agents* (rotavirus) constituyen el agente etiológico más importante de las gastroenteritis infantiles agudas no bacterianas [3-5, 7, 9 12, 15, 19, 21, 26, 27, 29, 30]. Bishop y col. observaron por primera vez este agente en 1973 en las células epiteliales del duodeno de niños con gastroenteritis infantiles no bacterianas [2]. A estas partículas virales se las llamó de diferentes maneras: *duovirus, orbivirus, rotavirus, reovirus-like*. Actualmente se los clasifica dentro de la familia de los *Reoviridae* [13], sin poder definir su genus. Morfológicamente son indistinguibles de aquellos virus que causan diarrea epidémica en terneros, ratones lactantes y otros mamíferos [14]. Nosotros en la Argentina lo encontramos por primera vez en 1975 en heces de niños con gastroenteritis aguda [23]. Nuestro objetivo, a través de este trabajo fue investigar la frecuencia con que este agente fue hallado en niños con diarrea aguda, y algunas de las características clínicas y epidemiológicas observadas en los mismos.

Material y métodos

Se estudiaron 133 niños de 1 a 30 meses con diarrea aguda (menos de 5 días de evolución) internados en un servicio de pediatría de un hospital general ubicado en la zona Oeste del Gran Buenos Aires, durante el período febrero 1976-marzo 1977. De los niños estudiados el 91 % fueron menores de un año, siendo la mediana de 5 meses. Aproximadamente un 50 % eran eutróficos y la diarrea fue moderada (deshidratación no mayor del 5-10 %) en la mayoría de los pacientes (87.2 %), acompañándose de fiebre y/o vómitos en un 42.9 %.

Para la investigación virológica se obtuvo en todos los casos una muestra de materia fecal al ingreso y suero del período agudo y de convalescencia (2-3 semanas) en 55 de ellos. Simultáneamente se estudió un grupo comparativo de 38 niños sin patología infecciosa con edad comparable y durante el mismo período [20, 24, 28, 31].

El material para observación por microscopía electrónica se preparó utilizando materia fecal (3-5 g) homogeneizada con agua destilada y Triclorotrifluoroetano centrifugando posteriormente a 5000 g 20 min 2 veces a fin de obtener un sobrenadante clarificado. Luego se lo centrifugó nuevamente a 145 000 g durante 50 min en un colchón de 3 ml de sacarosa al 40 % (p/v) en tubos de 11.5 ml de capacidad correspondiente al rotor 40 (Beckman). El *pellet* se resuspendió en 0.3 ml de agua destilada y se observó por tinción negativa en microscopía electrónica (ELMISHOP I). Concomitantemente se realizaron cultivos en células HEP-2 y en ratones lactantes para el estudio de virus habituales. Para el estudio serológico se realizó la prueba de fijación de complemento utilizando un antígeno rotavirus preparado por purificación en un gradiente de cloruro de cesio obtenido de las partículas virales del material tratado para la observación microscópica.

Resultados

Partículas típicas de rotavirus fueron detectadas por microscopía electrónica en

---

Recibido: 3-IX-1980. Aceptado: 2-X-1980.

Dirección postal: Hospital Nacional A. Posadas, 1706 Haedo, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

la materia fecal de 21 de los 133 niños estudiados (15.7 %), mientras que no se las observó en ninguno del grupo comparativo (Tabla 1).

TABLA 1. — *Rotavirus en materia fecal*
Grupo en estudio

Rotavirus	Casos	%
Positivo	21	15.7
Negativo	112	84.3
Total	133	100.0

Grupo control

Rotavirus	Casos	%
Positivo	0	0
Negativo	38	100
Tctal	38	100

Serológicamente se pudieron estudiar 11 de los 21 pacientes con rotavirus, 8 de ellos presentaron seroconversión (72.7 %), uno tuvo un título sugestivo y 2 fueron negativos.

De los 44 pares de sueros correspondientes a niños con diarrea, pero sin rotavirus, 13 (29.5 %) también tuvieron seroconversión, mientras que sólo 4 de los 32 sueros disponibles del grupo comparativo presentaron seroconversión. La distribución temporal de las diarreas con rotavirus mostró que la mayoría de nuestros casos (14/21) se produjeron en otoño. La edad de los niños señala que el 50 % tenían menos de 6 meses y la mayoría (85.7 %) eran menores de un año (Tabla 2).

TABLA 2

2- 6 meses	12 casos
7-12 meses	6 casos
13-24 meses	2 casos
24 meses	1 caso

La diarrea fue moderada y de buena evolución en todos los casos. Los pacientes presentaron fiebre y/o vómitos asociados a la diarrea en el 95 % (20/21) (Tabla 3).

TABLA 3. — *Signos y síntomas*

Signo/Síntoma	Casos	%
Vómitos	38	28.6
Fiebre	21	15.8
Fiebre y vómitos	57	42.9
Sin fiebre ni vómitos	17	12.8
Total	133	100.0

De las muestras de materia fecal una parte fue inoculada en cultivo de células de tejido HEP-2 y ratones lactantes, a fin de estudiar la presencia de otros virus. En 146 muestras correspondientes a casos de gastroenteritis y del grupo comparativo se detectaron Poliovirus tipo 3 en un caso de gastroenteritis en el cual se habían observado rotavirus por microscopía electrónica, Echovirus tipo 9 en un paciente con gastroenteritis; Echovirus tipo 12 en 2 controles; Coxsackie virus tipo A en un paciente con gastroenteritis asociada a rotavirus; Coxsackie virus tipo B en un paciente con gastroenteritis y 2 controles. Los Coxsackie virus fueron aislados en ratones lactantes.

Discusión

La etiología bacteriana en las gastroenteritis infantiles no epidémicas no explica más que un 25 a 35 % de los casos [12, 17]. El rol etiológico de los virus comunes (enterovirus adenovirus) resulta cuestionable debido a que se lo encuentra en cifras muy similares en niños con diarrea [1, 8, 11] y grupos controles. Este hecho fue corroborado en nuestro estudio. De acuerdo a las últimas investigaciones virológicas en estos procesos los rotavirus serían los causantes de la mayoría de las gastroenteritis agudas no bacterianas, habiéndoselas encontrado en frecuencias que oscilan entre el 10 y 42 % [19, 22]. Nosotros encontramos este agente por primera vez en la Argentina en 1975 [23]. El porcentaje de rotavirus asociado a niños internados con diarrea aguda, determinado en forma prospectiva a través de este estudio fue de aproximadamente el 20 %. Si bien estos resultados coinciden con otros autores difieren significativamente de los hallados en EE. UU., Canadá, Japón y Finlandia

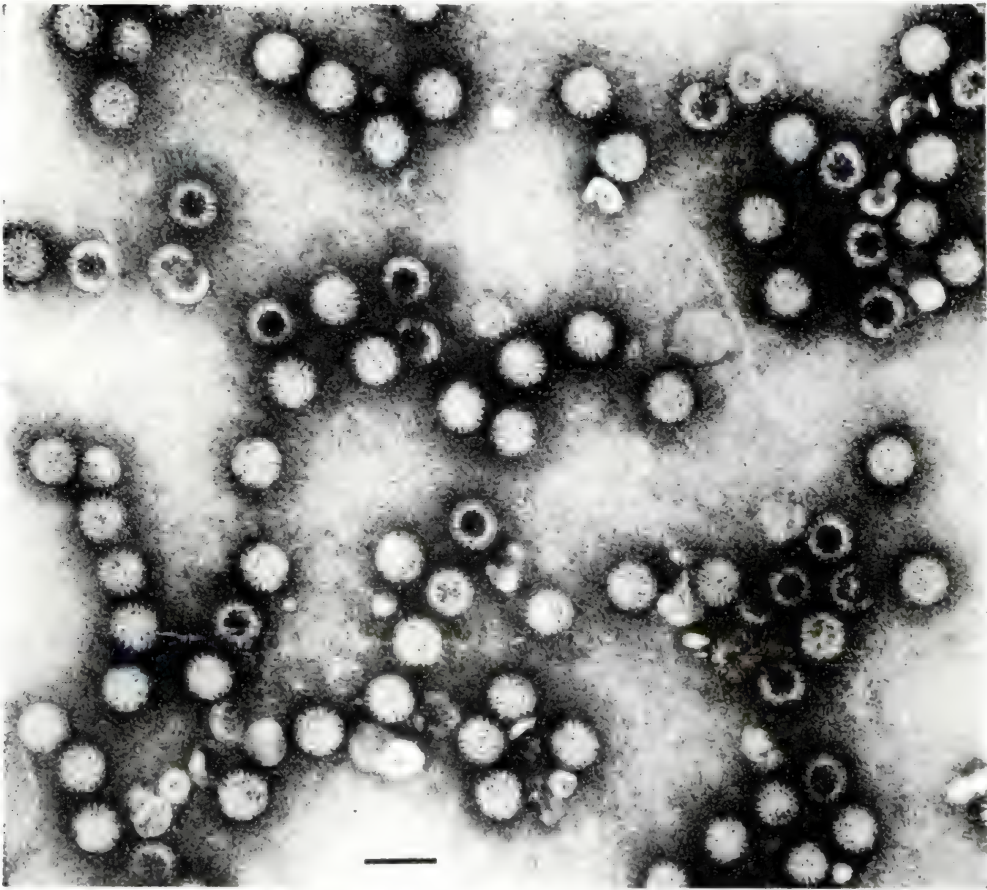


Fig. 1. — Representación electromicrográfica de rotavirus en materia fecal de un niño con diarrea. La mayoría de las partículas poseen cubierta externa y muy pocas son penetradas por el ácido fosfotúngstico (aumento de 125 000 x).

en que se los encuentra entre el 50 y 80 % [6, 17, 19, 22, 27, 30]. Una de las posibles causas de estas diferencias podrían estar dadas por factores climáticos (inviernos más fríos y prolongados en aquellos lugares). El predominio en lactantes y las características clínicas (diarrea de mediana intensidad y buena evolución) coincide con la mencionada en la mayoría de las publicaciones [18, 19, 22]. El estudio de la tendencia estacional muestra un predominio en los meses de otoño y cifras comparables en los meses de invierno y primavera. No se detectaron casos en verano. Las cifras elevadas observadas en un mes de ctoño, abril (11/15 casos) podrían corresponder a un brote epidémico de gastroenteritis por este virus.

La metodología utilizada por nosotros (microscopía electrónica) es la de elección para el diagnóstico directo [16, 19, 25]. A través del mismo se observaron partículas virales (Fig. 1).

En cuanto a los estudios serológicos sólo se pudieron realizar en 34 casos con diarrea y 20 controles. Hubo pacientes que presentaron seroconversión en los cuales no se encontró rotavirus en materia fecal. Esto podría explicarse por la desaparición rápida de las partículas virales en materia fecal como a la excesiva clorificación del material previa lectura por microscopía electrónica. Cabe destacar que serológicamente se detectaron anticuerpos en algún nivel en el 75 % de los niños con diarrea y 65 % del grupo comparativo, lo cual indicaría que la infección por rotavirus se produciría en forma significativa y predominante en la primera infancia. Consideramos que el hallazgo de los rotavirus

en el grupo de pacientes con gastroenteritis, la seroconversión observada y la ausencia en el grupo comparativo indican que este agente podría ser causante de gastroenteritis infantiles no bacterianas en un porcentaje significativo en nuestro medio. Sin embargo, consideramos que son necesarios nuevos estudios etiológicos de esta patología para determinar el verdadero rol de los rotavirus en nuestro país.

Resumen

En 133 niños, entre 1 y 30 meses de edad, con diarrea aguda moderada, internados en un Servicio de Pediatría del Gran Buenos Aires durante el período febrero 1976 - marzo 1977, encontramos el agente reovirus (rotavirus) por microscopía electrónica en el 15.7 % de los casos. En ninguno de los 38 pacientes sin patología infecciosa pertenecientes al grupo comparativo observamos este virus. La seroconversión en los niños con rotavirus fue del 72.7 %. La mayoría (85.7 %) fueron menores de 1 año, tuvieron fiebre y/o vómitos asociados a la diarrea (95 %), se produjeron en los meses de otoño y evolucionaron favorablemente. Los hallazgos de otros virus (enterovirus) por los métodos habituales no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos. La presencia de anticuerpos frente al rotavirus en algún nivel en el 75 % de los niños con diarrea y 65 % del grupo comparativo señalan que la infección por este agente se produce en forma considerable en la infancia. El hallazgo de los rotavirus en los pacientes con gastroenteritis, la seroconversión observada y su ausencia en el grupo comparativo indican que este agente fue responsable de gastroenteritis aguda en la infancia de nuestro medio.

Summary

ROTAVIRUS IN CHILDREN WITH ACUTE GASTROENTERITIS.

Recent and numerous studies carried out in different parts of the world, suggest that the rotavirus constitutes the most important etiological agent of acute infantile non-bacterial gastroenteritis. In Argentina we found it for the first time in feces of children with acute diarrhea in 1975. At a Pediatrics Service of a general Hospital near Buenos Aires city we observed this agent in 15.7 % of 133 children, by electron microscopic examination of stools, during a one year period (February 1976 - March 1977 (Table 1). The study group was comprised of 1 to 30 month old children (Table 2). All cases had moderate diarrhea with a benign course, and presented associated fever and/or vomiting in 95 % (20/21) (Table 3). A total of 38 children without infectious pathology were examined as control group. Serological studies were performed in 34 cases with diarrhea and in 20 of the control group. The serum conversion in the rotavirus group was 72.7 %. The presence of antibodies at some level against rotavirus in 75 % of children with diarrhea and in 65 % of the control group, shows that infection due to this agent is very frequent in infants. The observation of rotavirus in patients with gastroenteritis, the serological evidence and its absence in the control group, suggest that this agent is responsible for acute gastroenteritis in infants in our country.

Bibliografía

1. Banatvala JE, Totterdell B, Chrystte IL, Wood GN: In vitro detection of human Rotaviruses (Letter). *Lancet* 2: 281, 1975.
2. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruch BJ: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2: 1281, 1973.
3. Brandt CD et al: Comparative epidemiology of two rotavirus serotypes and other viral agents associated with pediatric gastroenteritis. *Am J Epidemiol* 110 (3): 243, 1979.
4. Brydeb AS, Gadket RE, Davies HA, Elewett TH: Rotavirus enteritis in the West Midlands during 1974. *Lancet* 2: 241, 1975.
5. Cameron DJS, Bishop RF, Davidson GP, Townley RRW, Holmes IH, Ruck BJ: New virus associated with diarrhea in neonates. *Med J Aust* 1: 85, 1976.
6. Conklin RH, Dupont HL, Goldschmidt MC, Rodríguez JT: Occurence of "viral particles" in diarrhea: Houston, Texas and Guatemala. *New Engl J Med* 292: 644, 1975.
7. Conklin RH, Portnoy BL, Spindler S, Dupont HL: Viral agents in acute childhood diarrhea from Houston and Guatemala. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. 15th. Washington D. C. (Abstr.), 1975.

8. Cramblett HG, Siewers CMF: The etiology of gastroenteritis in infants and children, with emphasis on the ocurrence of simultaneous mixed viral-bacterial infections. *Pediatrics* 35: 885, 1965.
9. Crivcksahnk JG, Zilberg B, Axton JHM: Virus particles and gastroenteritis in black and white children in Rhodesia. *S Agr Med J* 49: 859, 1975.
10. Davidson GP, Bishop RF, Townley RR, W Holmes IH, Ruck BJ: Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* 1: 242, 1975.
11. Dupont HL, Portnoy BL, Conklin RH: Viral Agent and Diarrheal illness. *Ann Rev Med* 28: 167, 1977.
12. Echeverría P, Homt, Blacklon NR, Quinnan G, Portnoy B, Olson JG, Conklin R, Dupont HL, Cross JH: Relative-importance of viruses and bacteria in the etiology of pediatric diarrhea in Taiwan. *J Infect Dis* 136: 383, 1977.
13. Fenner F, Camberra: Classification and nomenclature of viruses. Second Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
14. Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Brioger JC, Derrick JM: Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* 2: 61, 1974.
15. Flewett TH: Implications of recent virological researches in acute diarrhea in childhood.
16. Gómez-Barretto J, Palmer EL, Nahmias AI, Hatch MH: Acute enteritis associated with reovirus-like agents. *JAMA* 235: 1857, 1976.
17. Gurwith MJ, Williams TW: Gastroenteritis in children: a two year review in Manitoba, Etiology. *J Infect Dis* 136: 239, 1977.
18. Ishida N, Suzuki H, Konno T: Viruses causing acute gastroenteritis. *Igakundayumi* 91: 643, 1974.
19. Kapikian AZ, Kimwar Hynn, Wiatt RG, Cline Leew, Arrobio Ruta O, Brandt CD, Rodríguez WJ, Sack DA, Chanock RM, Parrot RH: Human Reovirus-like agent as the major pathogen associated with "Winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *New Engl J Med* 294: 965, 1976.
20. Kapikian AZ, Nyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chandok RM: Visualization by immune electron microscopy of a 27 mm particle associated with acute infections non-bacterial gastroenteritis. *J Virol* 10: 1075, 1972.
21. Kapikian AZ, KM HW, Nyatt RG, Rodríguez WJ, Ross S, Cline WL, Parrot RH, Chanock RM: Reovirus-like in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science* 185: 1049, 1974.
22. Konno T, Suzuk IH, Ishida N: Reovirus-like agent in japanese infants with gastroenteritis. *Lancet* 1: 918, 1975.
23. Lombardi G, Roseto A, Stamboulian D, Barrera Oro J: Virus of infantile gastroenteritis in Argentina. *Lancet* 2: 1311, 1975.
24. Martin ML, Palmer EL, Middleton PJ: Ultrastructure of infantile gastroenteritis virus. *Virology* 68: 146, 1975.
25. Middleton PJ, Abbott GD, Szymanski MT, Hamilton JR: Orbirus acute gastroenteritis of infancy. *Lancet* 1: 1241, 1974.
26. Orstavir I, Figenschau KJ, Hong KW, Ulstrup JCA: Reovirus-like agent (Rotavirus) in gastroenteritis of children: virus detection and serological studies. *Scand J Infect Dis* 8: 1-5, 1976.
27. Schnagl RD, Holmes IP, Moore B, Lee P, Dickinson FJ, Gust ID: An extensive rotavirus outbreak in an aboriginal infant in Central Australia. *Med J Australia* 1: 259, 1977.
28. Smith KO: Preparation of viruses for electron microscopy. *In:* Bush H (ed.) Methods in cancer research. Vol. Academic Press. New York, 562, 1976.
29. Steinhoff MC et al: Rotavirus infections of neonates (letter). *Lancet* 1: 775, 1978.
30. Tasure K, Hiroshi S, Aki I, Nakao I: Reovirus-like agents in acute epidemic gastroenteritis in japanese infants: fecal shepping and serologic response. *J Infect Dis* 135: 259, 1977.
31. Welch AB: Purification, Morphology and partial characterization of a reovirus-like agent associated with neonatal calf diarrhea. *Can J Comp Med* 35: 195, 1971.

— — — —

If an experiment is not worth doing, it is not worth doing well.

Si un experimento no vale la pena hacerlo, no vale la pena hacerlo bien.

PETER B. MEDAWAR

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 6-10 (1981)

TRANSLOCACION EQUILIBRADA *DE NOVO* EN UN NIÑO CON RETARDO MENTAL Y MALFORMACIONES

MARTA GALLEGO, R. COCO

Laboratorio de Citogenética del Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños, Buenos Aires

Individuos con translocaciones equilibradas generalmente no tienen fenotipos anormales, debido a que el contenido génico no ha sufrido cambios. Por lo tanto, el hallazgo de translocaciones aparentemente equilibradas en individuos con malformaciones y retardo mental es sorprendente. Este hallazgo puede ser coincidente, o bien deberse a una alteración cromosómica submicroscópica (pequeñas deleciones o inserciones en los puntos de rotura). Sin embargo, aún sin desequilibrio cromosómico, una translocación equilibrada puede producir un fenotipo anormal por mutaciones en los puntos de rotura, en uno o en ambos cromosomas, o bien por efecto de "posición de genes", definiéndose éste como la inactivación de genes o segmentos cromosómicos que se translocan adyacentes a una región heterocromática o de replicación tardía. Una de las maneras de visualizar efectos de posición de genes en el hombre, a nivel citológico, es analizando las translocaciones aparentemente equilibradas y tratar de correlacionar las roturas en regiones específicas con anormalidades fenotípicas. En el presente trabajo se comunica una translocación aparentemente equilibrada *de novo* entre los brazos largos de los cromosomas 12 y 17 en un niño con dismorfias y retardo mental. Además, se revisa las translocaciones equilibradas que involucran a los cromosomas 12 y 17 con el objeto de visualizar posibles mutaciones o efecto de posición de genes a nivel citogenético.

— — — —

Recibido: 17-IX-1980. Aceptado: 5-XI-1980.

Dirección postal: Laboratorio de Citogenética, CEDIE, División de Endocrinología, Hospital de Niños, Gallo 1330, 1425 Buenos Aires, Argentina.

CASO CLÍNICO

Niño de 12 años, séptimo hijo de una pareja no consanguínea, de 40 y 50 años de edad al nacimiento del propósito. No existen antecedentes familiares de importancia. Nacido de un embarazo a término en el cual no se registraron noxas. Parto eutócico. Peso de nacimiento 2600 g. Buen período neonatal y no se registraron problemas hasta las pautas madurativas que demostraron retardo.

El niño concurría a segundo grado de escolaridad común, pero al año de la consulta lo transfirieron a escolaridad de apoyo.

Al examen físico presentaba una talla de 123 cm (debajo del 5º percentilo), circunferencia cefálica de 51.5 cm (debajo del percentilo 10º) y las siguientes dismorfias: hipertelorismo ocular marcado, aperturas palpebrales de inclinación mongoloide, estrabismo divergente ocasional, nariz ancha y chata con fosas nasales horizontales, labios gruesos prominentes, paladar ojival, dientes mal implantados, orejas chicas bien implantadas, cuello corto, mamilas muy separadas e hipoplásicas, cubito valgus, limitación a la supinación y pronación de la muñeca, manos con palma chata y primer ortejo ancho en ambos pies.

Los exámenes complementarios (cardiológico y oftalmológico) fueron normales.

Dermatoglifos:

	Dígitos					Palmas	
	1	2	3	4	5	atd	t
Mano derecha	V	V	V	V	V	40°	t
Mano izquierda	PD	V	PC	V	V	45°	t
RTC = 241							

PD: presilla doble; V: verticilo; PC: presilla cubital; t: triradio axial; atd: ángulo que forman los triradios a, t y d; RTC: recuento total de crestas.

Estudio citogenético

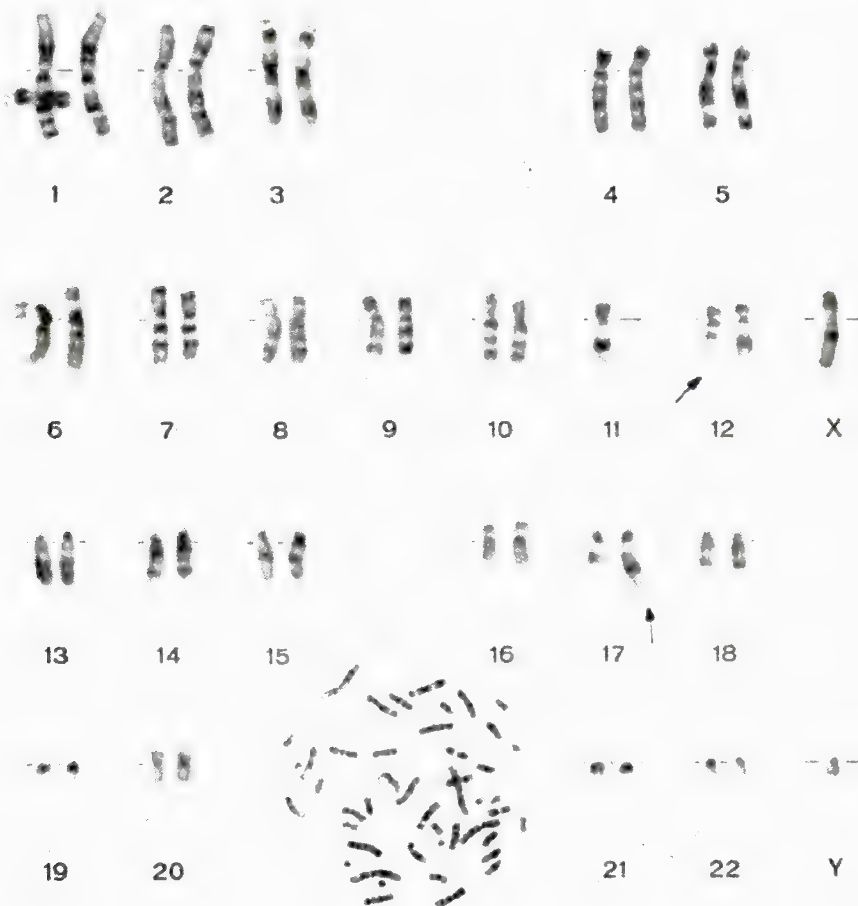
El estudio cromosómico del propósito y de los padres se realizó por cultivo de linfocitos de sangre periférica, de acuerdo con la técnica de Moorhead y col. [10]. Las preparaciones cromosómicas se colorearon con metodología convencional (coloración con Giemsa) y con técnica de bandeo G con Tripsina-Giemsa de acuerdo con Seabright [14].

El cariotipo convencional del propósito mostraba 46 cromosomas, con constitución sexual XY. En el grupo E faltaba un cromosoma 17 y en su reemplazo había un cromosoma metacéntrico similar a un 16. El cariotipo bandeado G mostró una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 12 y 17, siendo los puntos de rotura 12q15 y 17q25 (Fig. 1). La fórmula cromosómica de acuerdo con la Nomenclatura de Paris es: 46,XY,t(12;17) (q15;q25) (12pter → 12q15 : : 17q25 → 17 qter; 17pter → 17q25 : : 12q15 → 12qter).

El cariotipo de los padres con las mismas técnicas de estudio resultó normal.

Discusión

La aberración cromosómica hallada se interpretó como una translocación recípro-



CARIOTIPO 46, XY, t (12; 17) (q15; q25)

Fig. 1. — Cariotipo G-bandeado. Las flechas señalan los dos cromosomas translocados t_1: 12pter → 12q15 : : 17q25 → 17qter, y t_2: 17pter → 17q25 : : 12q15 → 12qter.

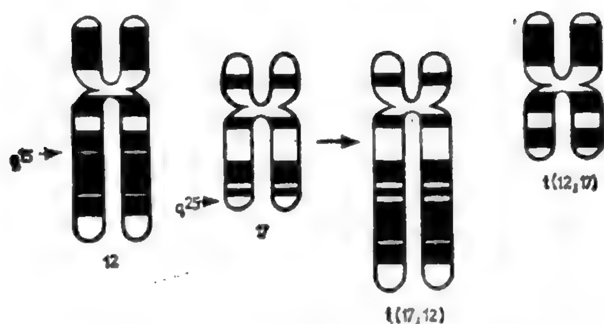
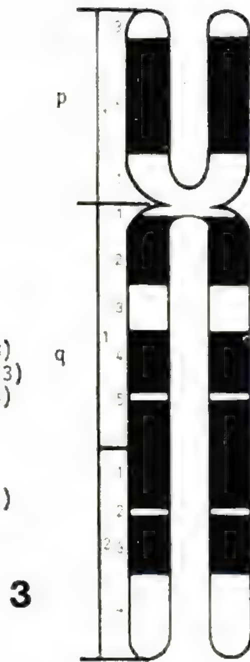


Fig. 2. — Esquema de la translocación recíproca equilibrada t (12;17) (q15;q25).

ca equilibrada *de novo* entre los brazos largos de los cromosomas 12 y 17 sin pérdida o adición aparente de material cromosómico (Fig. 2). Si bien esta anomalía es aparentemente equilibrada, se sugiere que puede ser la responsable del fenotipo anormal por un efecto de posición de genes. Para llegar a esta conclusión se mapearon los puntos de rotura de las translocaciones balanceadas que involucran a los cromosomas 12 y 17 comunicadas en la literatura, y se verificó si sitios específicos de rotura tenían influencia sobre el fenotipo. El mapeo de los puntos de rotura de los cromosomas 12 y 17 están representados en las Figuras 3 y 4. De las 40 translocaciones aparentemente equilibradas que involucran al cromosoma 12 y al 17: 14 correspondían al cromosoma 17 y 26 al cromosoma 12. Los fenotipos de los 14 casos de translocaciones involucrando al cromosoma 17, independientemente de los diferentes puntos de rotura, todos tenían un fenotipo normal con excepción de nuestro caso. En cambio, los fenotipos de las translocaciones involucrando al cromosoma 12 fueron anormales en 5 casos (incluido el nuestro), mientras que los restantes 21 casos fueron fenotípicamente normales. En los 5 casos que presentaban fenotipos anormales el punto de rotura era 12q15 en 4 casos (Biederman y Bowen [1], Franke [6], Hustinx y col. [7] y presente caso) y en un caso el punto de rotura era 12q21 (Pasquali y col. [12]). Los cinco individuos con fenotipo anormal y rotura en 12q15-21 tenían fenotipos divergentes. El paciente de Franke [6] tenía moderado retardo mental, ojos grandes con puente nasal prominente y maxilares hipoplásicos. El paciente de Hustinx y col. [7] tenía retardo mental severo, sinostosis radio-cubital, agenesia del cuerpo calloso y varias anomalías congénitas menores. El de Biederman y Bowen [1] presentaba fundamentalmente signos neurológicos sin malformaciones físicas. El paciente comunicado por Pascuali y col. [12] tenía un retardo mental moderado, microcefalía, micrognatia, hipertelorismo ocular y otras anomalías somáticas. El presente caso tiene un retardo mental moderado y varias anomalías somáticas menores. El estudio cromosómico de los progenitores fue estudiado en 4 de los 5 casos y en todos ellos resultó normal.

Es sugestivo que de las 26 translocaciones balanceadas que involucran al cromosoma 12, los cinco pacientes que tenían fenotipos anormales el sitio de rotura era 12q15-21. Por lo tanto, se sugiere que los fenotipos anormales de estos individuos se deben a un efecto de posición de genes más que a una mutación génica, ya que los fenotipos anormales son disímiles en los cinco pacientes. Además, este efecto de posición es debido a una región específica del cromosoma 12, y la diferencia en los fenotipos podría explicarse por supresión de diferentes genes o segmentos cromosómicos que se translocan adyacentemente a la región 12q15-21: segmento 18q23 → 18qter en el caso de la translocación t (12;18) (q15;q23) de Biederman y Bowen [1], segmento 6q20 → 6qter en el caso de la translocación t (6;12) (q20;q15) de Franke [6], segmento 19q13 → 19qter en el caso de la translocación t (12;19) (q15;q13) de Hustinx y col. [7], segmento 2p25 → 2pter en el caso de la translocación t (2;12) (p25;q21) de Pasquali y col. [12] y del segmento 17q25 → 17qter en la presente translocación t (12;17) (q15;q25).

Además, cabe consignar que en pacientes con retardo mental la incidencia de translocaciones recíprocas equilibradas *de novo* es mayor que la hallada en población general de recién nacidos (Jacobs [8] Coco y Penchaszadeh [3], Penchaszadeh y Coco [13], Breg [2], Nielsen y Sillesen [11]; por lo tanto este tipo de anomalías puede desempeñar un rol importante en la etiología del retardo mental.



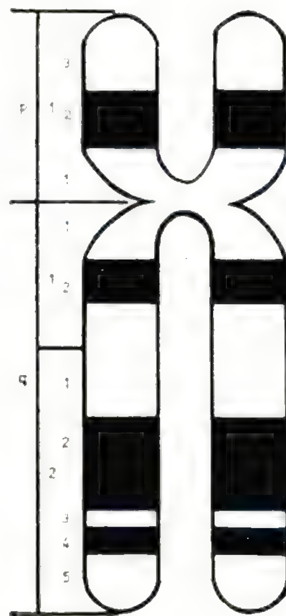


Fig. 3-4. — **3**, Mapeo de los puntos de rotura del cromosoma 12 en translocaciones aparentemente equilibradas. Relación fenotipo-puntos de rotura; **4**, Mapeo de los puntos de rotura del cromosoma 17 en translocaciones aparentemente equilibradas y su relación con el fenotipo.

Resumen

Se comunica el hallazgo de una translocación aparentemente equilibrada de novo *46,XY, t(12;17) (q15;q25) en un niño con malformaciones múltiples y retardo mental. El hallazgo de una translocación aparentemente equilibrada en un individuo con fenotipo anormal puede ser coincidente o bien deberse a una alteración submicroscópica tal como una pequeña deleción o inserción en los puntos de rotura. Sin embargo, excluyendo desequilibrio génico, el fenotipo anormal puede también deberse a una mutación en los puntos de rotura o a un efecto de posición. Revisando 26 translocaciones equilibradas involucrando al cromosoma Nº 12 y 14 involucrando al cromosoma Nº 17, pudimos ver que todas las translocaciones involucrando*

al cromosoma 12 tenían fenotipo normal, con excepción de 4 casos. Sorprendentemente, tres de estos últimos tenían rotura en 12q15 y uno en 12q21. Por otro lado, ninguno de los casos de translocaciones equilibradas involucrando al cromosoma 17 tenían fenotipo anormal. Por lo tanto el fenotipo anormal del paciente presentado aquí podría ser atribuido a un efecto de posición relacionado con rotura en 12q 15-21.

Summary

De novo BALANCED TRANSLOCATION IN A MALFORMED AND MENTALLY RETARDED BOY.

A malformed and mentally retarded child with de novo *apparently balanced translocation 46,XY, t(12;17) (q15;q25) is reported. The finding of abnormal phenotype in an individual with balanced translocation may be coincidental or may be due to some submicroscopic chromosomal alteration such as deletions or insertions at the breakpoints. However, excluding genetic imbalance, the abnormal phenotype can also be due to a mutation at the breakpoints or a position effect. Reviewing 26 balanced translocations involving chromosome Nº 12, and 14 involving chromosome Nº 17, it was observed that all balanced translocations involving chromosome 12 had a normal phenotype, except four. Strikingly three of the latter included 12q15 band, and one 12q21. On the other hand, none of the balanced translocations involving chromosome 17 had an abnormal phenotype. Therefore, the abnormal phenotype in our report could be attributed to a position effect related with breaks at 12q15-21.*

Agradecimientos: Los autores agradecen a los doctores María del Valle Torrado y Flora Slasky de la Fundación de Genética Humana por haber referido al paciente al estudio citogenético. Este trabajo en parte fue subvencionado con fondos del CEDIE (Laboratorio de Citogenética del Centro de Investigaciones Endocrinológicas) y CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Bibliografía

1. Biederman B, Bowen P: Balanced translocation involving chromosome 12: Report of a case and possible evidence for position effect. *Ann Génét* 19: 257, 1976.
2. Breg WR: Euploid structural rearrangements in the mentally retarded. Population Cytogenetics. Hook EB, Porter EI eds. Academic Press, New York, 1977, p 99.
3. Coco R, Penchaszadeh VB: Frequency of chromosomal aberrations in 131 patients with multiple congenital malformations and mental retardation. *J Pediat* 89: 325, 1976.
4. Coco R, Gallego M, Torrado M: Translocación recíproca equilibrada 46,XY, t(12;17) (q15;q25) con fenotipo anormal. Posible efecto de posición en 12q15. *Medicina (Bs Aires)* 36: 771, 1979.
5. Coco R: Comunicación personal.
6. Franke U: Quinacrine mustard fluorescence of chromosomes: characterization of unusual translocations. *Am J Hum Genet* 24: 189, 1973.
7. Hustinx TWJ, Gabreels FJM, Rutten FJ, Korten JJ, Scheres JMJC, Jousten EMG, Gilbers THJ: A mentally retarded child with a translocation involving chromosome 12 and 19. *J Med Genet* 12: 207, 1975.
8. Jacobs PA: Correlation between euploid structural chromosome rearrangements and mental subnormality in humans. *Nature* 249: 164, 1974.
9. Jacobs PA, Matsmura JS, Newlands IM: A cytogenetic survey of an institution for the mentally retarded: I. Chromosome abnormalities. *Clinical Genetics* 13: 37, 1978.
10. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20: 613, 1960.
11. Nielsen J, Sillesen I: Incidence of chromosome aberrations among 11148 newborn children. *Humangenetik* 30: 1, 1975.
12. Pasquali F, Zuffardi O, Zamboni G, Bernardi F: Translocation t(2;12) (p25;q21) classée d'abord comme 2/X. *Ann Génét* 18: 64, 1975.
13. Penchaszadeh VB, Coco R: Chromosome aberrations in mental retardation and multiple congenital anomalies: A study of 161 patients. *Excerpta Medica*, Int Cong Series Nº 397, 145, 1976.
14. Seabright M: The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosome of man. *Chromosoma* 36: 204, 1972.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 11-18 (1981)

ANDROGEN THERAPY DURING MYELOBLASTIC LEUKEMIA REMISSION INDUCED BY TWO DRUG COMBINATIONS *

S. PAVLOVSKY, CRISTINA SCAGLIONE, MARIANA EPPINGER-HELFT, F. SACKMANN MURIEL, A. MACCHI †, G. GARAY, F. CAVAGNARO, V. BIRMAN, J. DUPONT, A. SUAREZ, MARTA O. DRAGOSKY, C. A. BARROS

Grupo Argentino de Tratamiento de la Leucemia Aguda (GATLA), Buenos Aires

The inclusion of cytosine arabinoside (Ara.C) and daunomycin (DNM) in the treatment of acute myeloblastic leukemia has produced an increase of the complete remission rate. However, in opposition to acute lymphoblastic leukemia where the percentage of complete remissions according to different schedules with two or three drugs is similar in a single institution or in large cooperative trials, the results of different combination therapies in acute myeloblastic leukemia reported by a single institution in a relatively small number of patients are always higher than those obtained by a cooperative group[2-4, 7, 9, 11, 12]. In two consecutive studies in acute myeloblastic leukemia performed by our group a triple combination with DNM-vincristine (VCR) and prednisone (PRED) followed by two or more courses of Ara. C and 6 mercaptopurine (6 MP) produced a complete remission rate of 42 % and 44 % in 114 and 181 patients respectively[3, 4]. Rai et al[9] from the Cancer and Leukemia Group B (CALGB) compared two schedules of Ara.C-DNM, Ara.C 100 mg/m^2 and DNM 45 mg/m^2. Schedule A: Ara.C x 7 days and DNM x 3 days, and schedule B: the same drugs at the same dosages for only 5 and 2 days, respectively. Seventy seven percent achieved com-

---

Received: 19-VIII-1980. Accepted: 6-X-1980.

* Presented at the meeting of the American Association for Cancer Research, San Diego, California, May 1980.

† Deceased in 1980.

Postal address: GATLA, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina.

This study was conducted in the following institutes by the investigators mentioned below:

1) Instituto de Investigaciones Hematológicas: A. Pavlovsky, S. Pavlovsky, G. Garay, C. Scaglione, J. Dupont, N. Roizman.
3) Instituto Municipal de Hematología: M. Eppinger-Helft, G. Hidalgo.
3) Hospital de Niños de Buenos Aires: F. Sackmann Muriel, J. Peñalver, L. Braier, V. Maro, P. Bustelo.
4) Centro de Educación Médica e Investigación Clínica: A. Suárez, R. Cacchione, J. Egozcue.
5) Instituto Modelo de Clínica Médica "Luis Agote": A. Macchit.
6) Hospital "Teodoro Alvarez": F. Cavagnaro, R. Urribarri, R. Bezares.
7) Hospital Escuela "Gral. San Martín": C. Barros, J. Pileggi, H. de María, R. Kvicala, E. Bugnard, C. Russo and M. Curutchet.
8) Hospital Israelita: M. O. Dragosky, H. H. Murro and M. A. Sorrentino.
9) Hospital "Clemente Alvarez": J. Saslavsky, J. Lein.
10) Hospital Ferroviario Central: E. Quiroga Micheo, S. Calabria, S. Rudoy.
11) Hospital Militar Central: A. Musso, M. I. Santos.
12) Policlínico "Mariano Castex": M. Palau, S. de Sica.
13) Hospital de Pediatría "Pedro de Elizalde": J. M. Divito, J. C. Porta.
14) Instituto "Gral. San Martín", La Plata: L. Bergna, R. Tur.
15) Hospital Nacional "A. Posadas": E. Dibar, I. Sica, I. Freitas, A. Picon.
16) Hospital de Niños de Córdoba: F. Ojeda.

plete remission in schedule A and 53 % in schedule B ($p < 0.05$). All the methods employed to prolong the duration of complete remission gave disapointing results (intermittent or continuous maintenance therapy, immunotherapy, early intensification, etc.) in our experience and in that of others. Remission duration in the various studies ranged from a median of 3.5-12.0 months [5-7]. Sotto et al [10] reported that the use of androgens (stanozolol) in association with chemotherapy prolonged the duration of complete remission in acute myeloblastic leukemia compared to other published studies. The rate of complete remission reported at 2 years was 76 %. This was a non randomized study. A study was designed by GATLA with the following objectives: 1) to find out which is the best schedule of induction therapy, *a)* the combination of DNM-VCR-PRED followed by Ara.C-6MP designed by GATLA, or *b)* the regimen DNM x 3 days, Ara. C x 7 days designed by the CALGB; 2) to study the usefulness of stanozolol in a randomized study as adjuvant of maintenance chemotherapy, with an appropiate control group receiving chemotherapy alone.

Material and methods

This study was opened in March 1976 and closed in September 1979. It included all the patients of any age with acute myeloblastic leukemia, (including myelomonoblastic, monoblastic, promyelocitic and acute erythroleukemia) who had not been previously treated. A total of 251 patients entered the study; 6 were considered non evaluable and 245 were evaluable: 69 children under 15 years of age, 93 between 16 to 45 years and 84 with more than 45 years of age. The diagnosis was made by peripheral blood and bone marrow smear examination, plus PAS and peroxidase reaction.

Drugs and Dosage

Induction of remission: Schedule A: DNM 40 mg/m^2/iv weekly, VCR 1.5 mg/m^2/iv weekly and PRED 40 mg/m^2/daily for 3 weeks, followed by two or more courses of Ara C 100 mg/m^2/day iv every 12 hours and 6MP 2.5 mg/kg/daily, orally for 5 days. Schedule B: DNM 40 mg/m^2/iv daily for 3 days and Ara C 100 mg/m^2 day iv every 12 hours for 7 days. Those who did not achieve complete remission received further courses of DNM for 2 days and Ara C for 5 days (Fig. 1).

Maintenance: Ara C 100 mg/m^2/daily subcutaneous every 12 hours for 5 days, 6MP 2.5 mg/kg/daily for 5 days and CCNU 75 mg/m^2/orally for 1 day followed in alternating sequences every 4 weeks by VCR 1.5 mg/m^2/iv for 1 day, DNM 40 mg/m^2/iv for 1 and PRED 40 mg/m^2/daily,

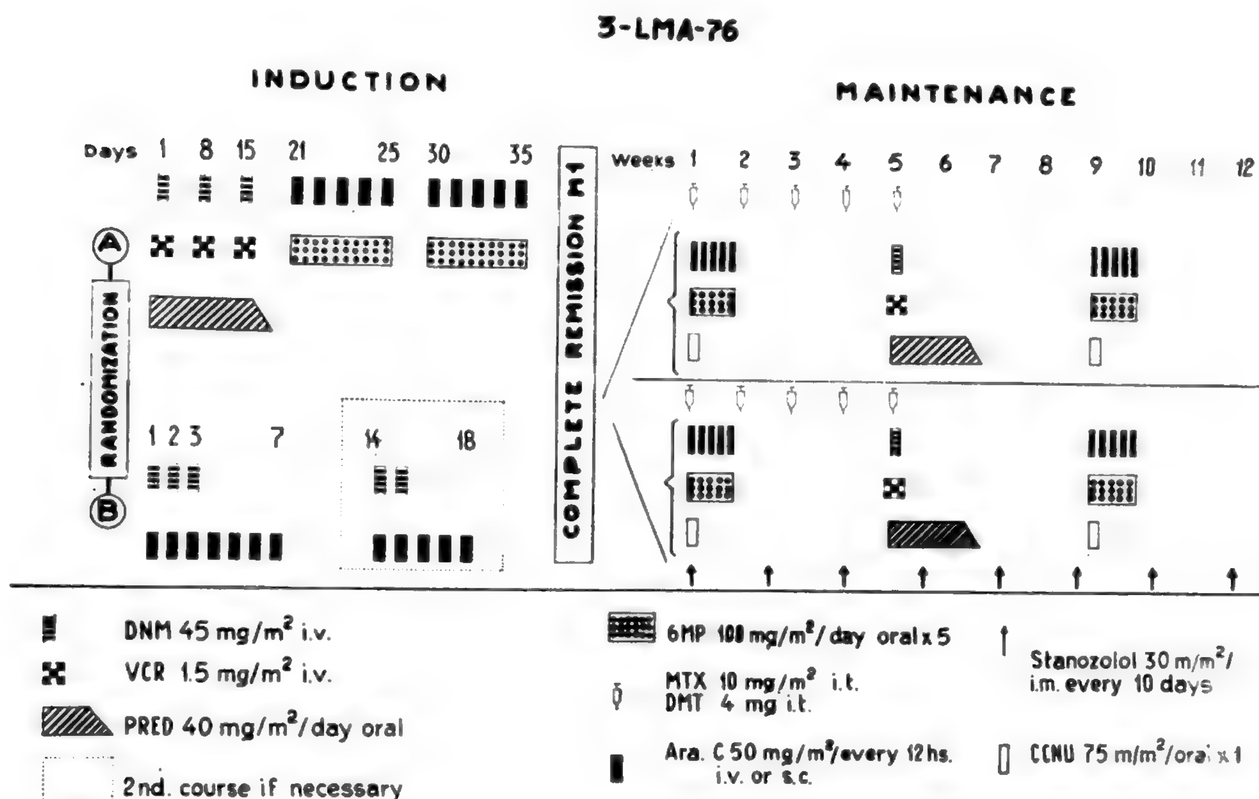
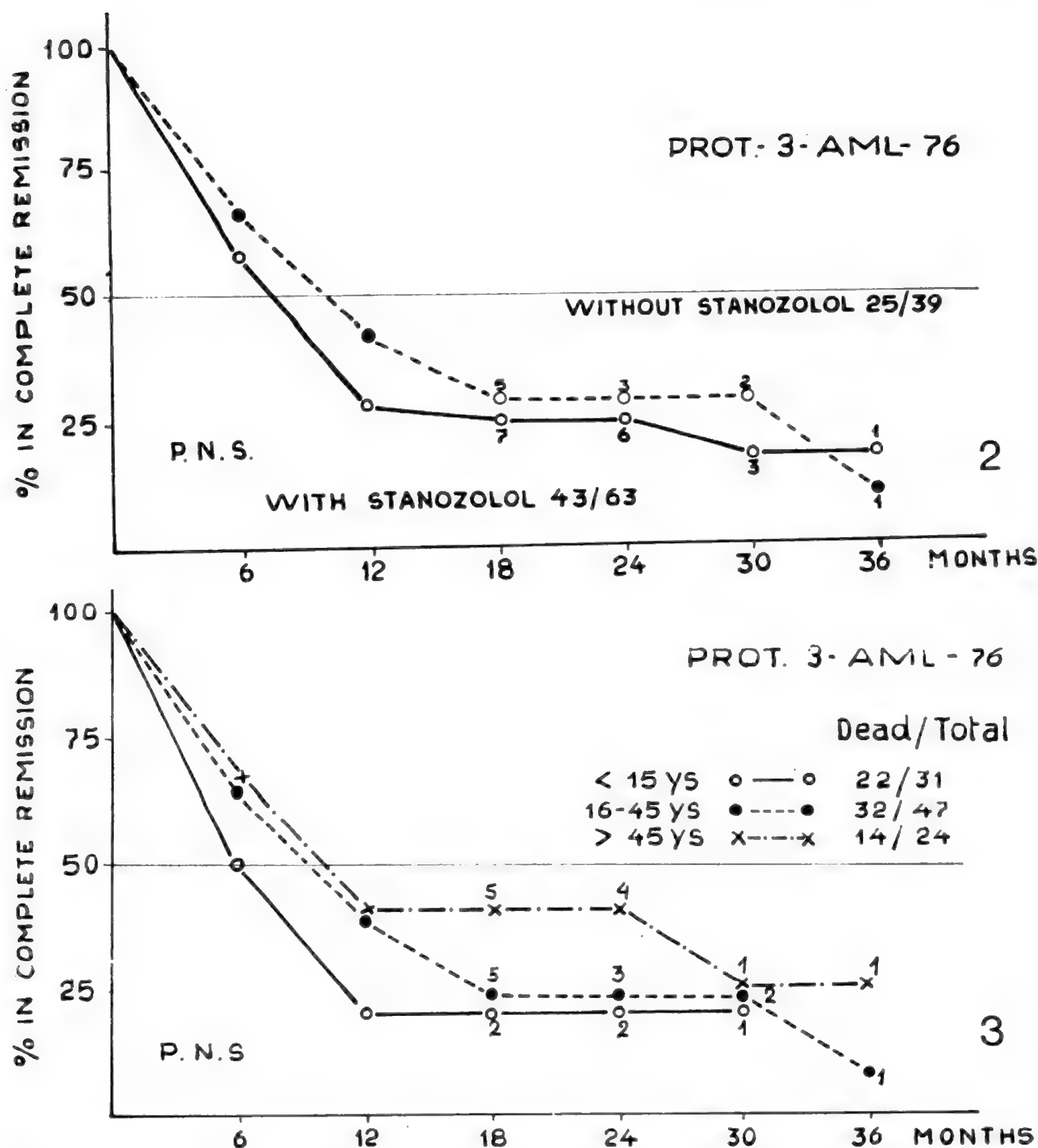


Fig. 1. — Treatment schedule for previously untreated acute myelocytic leukemia (Protocol 3-AML-76).



Figs. 2-3. — 2, Duration of complete remission in previously untreated acute myelocytic leukemia according to treatment or non-treatment with stanozolol. The number after the caption of each curve shows relapsed/total number of patients, and the numbers in the curve show patients still in complete remission at that time. The differences between curves were estimated by the log rank test; 3, Duration of complete remission in acute myelocytic leukemia according to age.

orally for 7 days. A group allocated at random received stanozolol 30 mg/m²/im every 10 days. The control group received only chemoterapy. Randomization for both induction and maintenance treatments was done at diagnosis with stratification according to age. The randomization was not followed strictly by some Institutions. For different reasons, this was the reason for the different number of patients in both groups. No patient was excluded for improper randomization.

All the patients received five doses of IT MTX ($12\ mg/m^2$) and dexamethasone ($3\ mg/m^2$) during the first month of complete remission.

The definitions of complete remission, partial remission, CNS relapse and statistical methods employed were explained in a previous report [4].

Results

Induction of remission: Of the 245 evaluable cases, complete remission was achie-

ved in 102 (42 %). The complete responses of the 151 patients on regimen A and the 95 patients on regimen B were 40 and 43 %, respectively. This difference was not statistically significant. Eighteen of the 245 cases had partial remission, 46 failed to respond in spite of completing the induction therapy and 80 died during induction therapy (Table 1).

TABLE 1. — *Results of induction treatment according to schedule*

Schedule	CR		Response			
	#	%	RP	Null	Died	Total
"A" DNM-VCR-PRED followed by Ara C-6 MP	61	40	11	31	48	151
"B" DNM × 3 and Ara C × 7	41	43	7	15	32	95
Total	102	42	18	46	80	245

Comparing both regimens according to different age periods, no statistically significant difference was observed. Patients under 16 years old had 45 % of complete remission, between 16 and 45 years old, 50 % and over 45 years old, 29 % of complete remission. There is a statistically significant difference of $p < 0.05$ between less than 16 years vs more than 45 years and of $p < 0.005$ between 16 to 45 years vs more than 25 years (Table 2). The median time needed to achieve complete remission was 7.6 weeks in regimen A (range 3 to 16) and 6.7 weeks in regimen B (range 2 to 16).

The hematopoietic toxicities were more severe in regimen B: 47 % of the patients

TABLE 2. — *Percent of complete remission according to age and schedule of induction treatment*

	< 16 γs			16 to 45 γs			>45 γs		
Schedule	CR/Total		%	CR/Total		%	CR/Total		%
A	23	50	46	24	53	45	14	48	29
B	8	19	42	23	40	57	10	36	28
Total	31	69	45	47	93	50	24	84	29

had at least one episode of leukopenia under 1000 WBC count during induction treatment compared to 30 % in regimen A ($p < 0.01$). Gastrointestinal toxicity and alopecia were similar in both regimens.

Duration of complete remission: Twenty five out of 39 patients treated without stanozolol relapsed with a median duration of complete remission of 10 months, compared to 43 out of 63 patients in the regimen with stanozolol. The median duration of complete remission was 7 months. Twenty nine percent and 18 % of the patients treated without and with stanozolol remain in complete remission at 30 months. The difference was not statistically significant (Fig. 2).

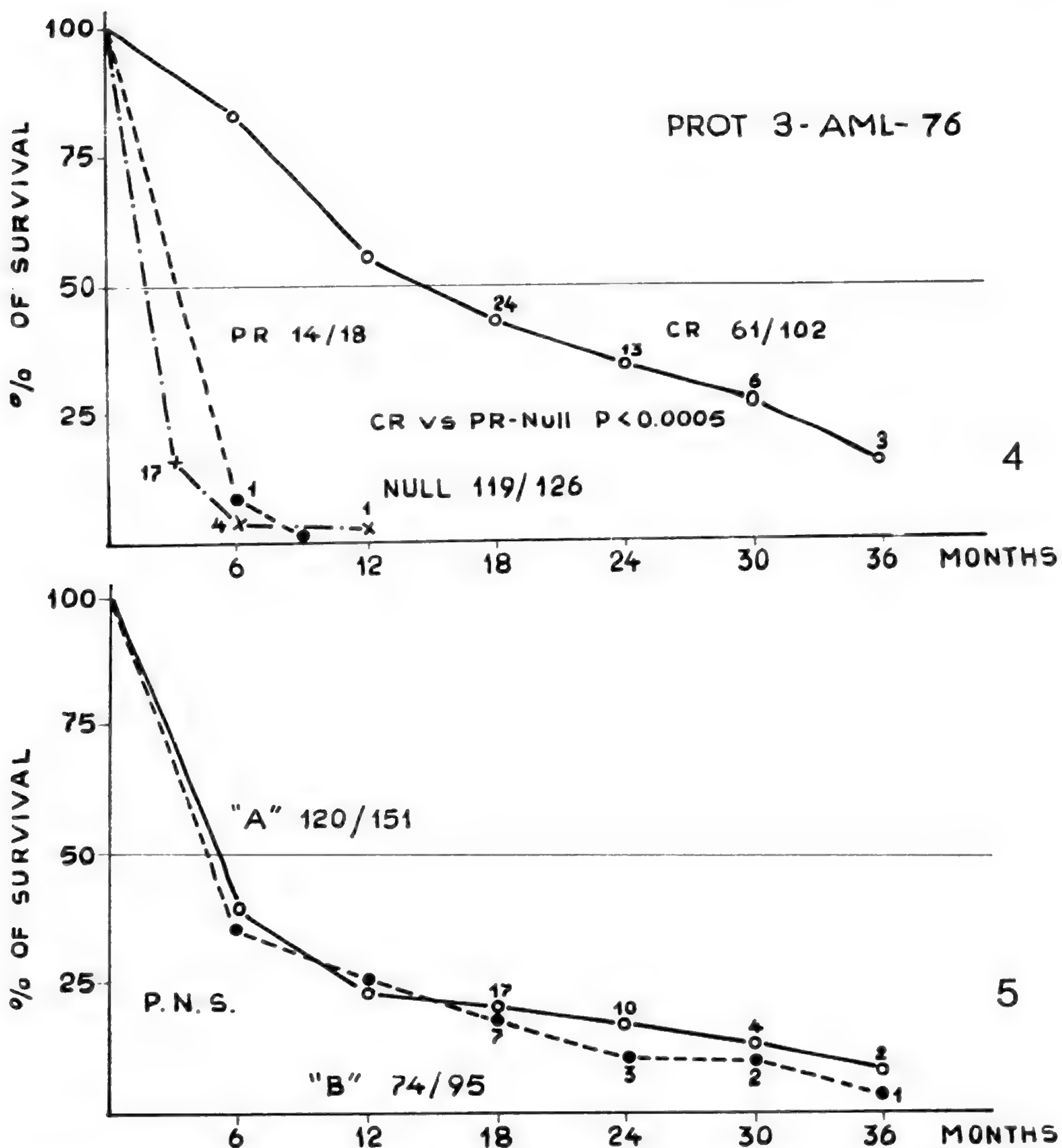
The duration of complete remission according to age shows no difference in the three age groups; however, the pediatric group yielded the worse results (Fig. 3).

Survival: Patients who achieved complete remission had a median survival of 14 months, 27 % remaining alive at 30 months. For those who achieved partial response the median survival was 3 months and less than a month in those who failed to respond or died during induction. Patients who achieved complete remission had a significantly better survival than those with partial remission or non responders ($p < 0.0005$) (Fig. 4).

The median survival of all treated patients in both induction regimens was similar (5 months) 12 % of the patients remaining alive at 30 months (Fig. 5).

Discussion

This study was designed to compare the effectiveness of a previously reported[3, 4] regimen of our group and a regimen reported by the CALGB[9] and to compare the value of an androgen (stanozolol) as adjuvant of maintenance chemotherapy for prolonging complete remission. In the two previous studies[3, 4] using the same regimen and a similar type of patients the percent of complete remission was 42 and 44 %, similar to the present study (40 %) in regimen A. The CALGB group[9] reported 77 % of complete remissions employing



Figs. 4-5. — 4, Survival in AML according to therapeutic response; 5, Survival in AML according to type of induction treatment.

the regimen B (Ara C x 7 days and DNM x 3 days) and this was statistically superior to a regimen of Ara C x 5 days and DNM x 2 days ($p < 0.05$). However, the number of patients was relatively small (43 in each group). Recently, the same cooperative group[12] published a larger study with 523 patients, previously untreated and randomly allocated to three induction therapies with: DNM for 3 days alone, Ara C plus 6-thioguanine or DNM on day 1 and on days 1-5 Ara C and 6-thioguanine. The porcentage of complete remission was 42 %, 44 % and 50 %, respectively.

Another large cooperative study carried out by the Southwest Oncology Group[2] reported the results of 274 adults with acute myeloblastic leukemia randomly treated with three regimens: VCR-PRED-

Ara C and cyclophosphamide (CTX) (COAP) or DNM instead of CTX (DOAP) or only VCR-PRED-Ara C (OAP). The remission rates were 37 %, 35 % and 43 % respectively, median lengths of remission were 40, 45 and 90 weeks, median survival was 7, 11 and 8 weeks. No statistically significant difference was found among treatments, and results were similar to those obtained in the present study.

In spite of the improvement in the last decade of the rate of complete remission with the inclusion of Ara C-DNM and the combination of both in several two, three and four drug regimens, disappointing results were obtained in the effort to prolong complete remission. Several trials have been performed using different methods of consolidation, maintenance (mainly continuous and intermittently). immunotherapy (with BCG, MER, C. Parvum, etc.) and all of them report a brief duration of remission (6 to 12 months) similar to that obtained in unmaintained patients [2-7, 11, 12]. In the last years, two papers report prolonged duration of complete remission. Neither had a proper randomized control and they compared the results with historic or reference groups of patients. Bodey et al [1] report a relapse rate of less than 30 % in patients who were treated with late intensification therapy (after remission of one or more years).

Sotto et al [10] report that the use of androgens (stanozolol 0.15 mg/kg/day) associated with the treatment of acute non lymphoblastic leukemia, and throughout the maintenance period, significantly prolongs the duration of complete remission compared to reference studies. The rate of complete remission at 2 years was estimated in 76 %. The present study does not confirm that stanozolol prolongs the duration of complete remission. The median duration of complete remission was 7 and 10 months with and without stanozolol, remaining in complete remission 25 % and 20 % respectively at 2 years (p = NS). Stanozolol was given daily and orally in Sotto's study compared to im and every 10 days in the present study. However, another French study performed by several institutions in a properly randomized trial using stanozolol daily, orally, since diagnosis, failed to show any difference in the length of remission between the group with chemotherapy alone vs chemotherapy plus stanozolol (C. Jacquillat: personal comunication).

The present study also failed to demonstrate any difference between both induction regimens in the medians lengths of survival, 4.8 and 5.2 months, respectively, for schedule A and B. The results of this study confirm what was previously reported [4]: that elderly patients have fewer chances of obtaining complete remission than younger ones; however, the duration of complete remission is better or at least equal and the major prognostic factor for measuring survival in acute myeloblastic leukemia is the response status.

Summary

This study was designed to answer two questions: 1) which induction combination is more effective to induce remission in previously untreated patients with acute myeloblastic leukemia: a) daunomycin (DNM), vincristine (VCR) and prednisone (PRED) followed by courses of cytosine arabinoside (Ara C) plus 6-mercaptopurine (6 MP) employed by GATLA, or b) Ara C × 7 days plus DNM × 3 days employed by CALGB; 2) whether the use of stanozolol as adjuvant of maintenance therapy prolongs complete remission. Induction: Schedule A: DNM 45 mg/m²/week × 3, VCR 1.5 mg/m²/week × 3 and PRED 40 mg/m²/daily × 21 days followed by Ara. C 100 mg/m²/daily every 12 h × 5 days and 6 MP 100 mg/m²/daily × 5 days. Schedule B: Ara. C 100 mg/m²/daily every 12 h × 7 days with DNM 45 mg/m²/daily × 3 days. Maintenance therapy: Monthly courses of Ara C; 6 MP × 5 days plus CCNU 75 mg/m²/daily × 1 or DNM, VCR × 1 dose and PRED × 7 days in sequential months at the same doses of induction. Patients of both schedules, when in complete remission, were randomized to receive either stanozolol 30 mg/m²/im every 10 days or no treatment during maintenance therapy. A total of 246 patients were evaluable; 61 (40 %) of 151 achieved complete remission in schedule A and 41 (43 %) of 95 patients in schedule B (p = NS). Me-

dian duration of complete remission in 63 patients with androgen therapy was 8 months and 10 months in the control group (p = NS); 18 % and 29 %, respectively, are still in complete remission at 30 months. These results show that both induction treatments have a similar rate of response and that androgen therapy used in combination with maintenance therapy does not prolong the duration of complete remission.

Resumen

ANDROGENOTERAPIA DURANTE LA REMISIÓN DE LA LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA INDUCIDA POR DOS COMBINACIONES DE DROGAS.

Se diseñó este estudio con los siguientes objetivos: 1) Cuál de las combinaciones utilizadas es más efectiva en la inducción de la remisión en pacientes con leucemia mieloblástica aguda sin tratamiento previo: a) daunomicina (DNM), vincristina (VCR) y prednisona (PRED) seguido de cursos de citosina arabinósida (C Ara) más 6-mercaptopurina (6-MP) utilizado por GATLA, o b) C Ara × 7 días más DNM × 3 días utilizado por el CALGB; 2) si el uso de androgenoterapia con estanozolol como adyuvante del tratamiento de mantenimiento prolonga la remisión completa. Inducción: Esquema A: DNM 45 mg/m²/semana × 3, VCR 1.5 mg/m²/semana × 3 y PRED 40 mg/m²/día × 21 días seguido de C Ara 100 mg/m²/día cada 12 h × 5 días y 6 MP 100 mg/m²/día × 5 días. Esquema B: C Ara 100 mg/m²/día cada 12 h × 7 días con DNM 45 mg/m²/día × 3 días. Mantenimiento: Cursos mensuales de C Ara; 6 MP × 5 días más CCNU 75 mg/m²/día × 1 o DNM, VCR × 1 dosis y PRED × 7 días en meses consecutivos a las mismas dosis que en la inducción. A los pacientes de ambos esquemas, en remisión completa se los ubicó al azar para recibir estanozolol 30 mg/m²/im cada 10 días o ningún tratamiento durante la terapia de mantenimiento. Un total de 246 pacientes fueron considerados evaluables; 61 (40 %) de 151 pacientes lograron remisión completa en el esquema A y 41 (43 %) de 95 pacientes en el esquema B (p = NS). La duración media de remisión completa en 63 pacientes con andrógenoterapia fue de 8 meses y en el grupo control 10 meses (p = NS); 18 % y 29 %, respectivamente, se hallan todavía en remisión completa a los 30 meses. Estos resultados muestran que ambos tratamientos de inducción tienen un índice de respuesta similar y que el tratamiento con andrógenos utilizado en combinación con el tratamiento de mantenimiento no prolonga la duración de la remisión completa.

Acknowledgment: The authors are grateful to Mr. Daniel Goldar for the statistical analysis and to Miss Isabel Kabat for typing the manuscript.

References

1. Bodey GP, Freireich EJ, Gehan E, McCredie K, Rodríguez V, Gutterman J, Burgess A: Late intensification therapy for acute leukemia in remission. Chemotherapy and immunotherapy. *JAMA* 235: 1021, 1976.
2. Coltman CA, Bodey GP, Hewlett JS, Haut A, Bickers J, Balcerzak SP, Costanzi JJ, Freireich EJ, Mc Credie KB, Groppe C, Smith TL, Gehan EA: Chemotherapy of acute leukemia. A comparison of vincristine, cytarabine and prednisone alone and in combination with cyclophosphamide or daunorubicin. *Arch Intern Med* 138: 1342, 1978.
3. Eppinger Helft M, Pavlovsky S, Suárez A, Sackman Muriel F, Hidalgo G, Pavlovsky A, Vilaseca G: Sequential therapy for induction and maintenance of remission in acute myeloblastic leukemia. *Cancer* 35: 347, 1975.
4. Eppinger Helft M, Pavlovsky S, Hidalgo G, Sackmann Muriel F, Suárez A, Garay G, Russo C, Santos M, Macchi A, Lein J: Chemoimmunotherapy with corynebacterium parvum in acute myelocytic leukemia. *Cancer* 45: 280, 1979.
5. Gale RP: Advances in the treatment of acute myelogenous leukemia. *New Engl J Med* 300: 1189, 1979.
6. Omura GA, Vogler WR, Lynn MJ: A controlled clinical trial of chemotherapy vs BCG immunotherapy vs no further therapy in remission maintenance of acute myelogenous leukemia. *Proc Am Assoc Cancer Res Am Soc Clin Oncol* 18: 272, 1977.
7. Pavlovsky S, Peñalver J, Eppinger-Helft M, Sackmann Muriel F, Bergna L, Suárez A, Vilaseca G, Pavlovsky AA, Pavlovsky A: Induction and maintenance of remission in acute leukemia. *Cancer* 31: 273, 1973.
8. Pavlovsky S, Eppinger-Helft M, Sackmann Muriel F: Factors that influence the appearance of central nervous system leukemia. *Blood* 42: 935, 1973.
9. Rai KR, Holland JF, Glidewell O: Impro-

vement in remission induction therapy of acute myelocytic leukemia. *Proc Am Assoc Cancer Res Am Soc Clin Oncol* 16: 265, 1975.

10. Sotto JJ, Hollard D, Schaerer R, Bensa JC, Seigneurin D: Androgenes et remissions prolongées dans les leucemies aigues non lymphoblastiques. Resultats d'un traitement systematique par le stanozolol associe a la chimiotherapie. *Nouv Rev Fr Hemat* 15: 57, 1975.
11. Weil M, Jacquillat C, Gemon-Auclerc MF, Chastang CL, Izrael V, Boiron M, Bernard J: Acute granulocytic leukemia. *Arch Intern Med* 136: 1389, 1976.
12. Wiernik PH, Glidewell OJ, Hoagland HC, Brunner KW, Spurr CL, Cuttner J, Silver RT, Carey RW, Del Duca V, Kung FH, Holand JF: A comparative trial of daunorubicin, cytosine arabinoside and thioguanine and a combination of the three agents for the treatment of acute myelocytic leukemia. *Med Ped Oncology* 6: 261, 1979.

- - - -

Scientists are people of very dissimilar temperaments doing different things in very different ways. Among scientists are collectors, classifiers and compulsive tidyers-up; many are detectives by temperament and many are explorers, some are artists and other artisans. There are poet-scientists and philosopher scientists and even a few mystics. What sort of mind or temperament can all these people be supposed to have in common. Obligative scientists must be very rare, and most people who are in fact scientists could easily have been something else instead.

Los investigadores son gente de diferente temperamento y que hacen distintas cosas de muchas maneras diferentes. Entre los investigadores hay coleccionistas, clasificadores, escrupulosos, muchos son por temperamento detectives y muchos son exploradores, algunos artistas y otros artesanos. Hay investigadores poetas e investigadores filósofos y aun algunos místicos. ¿Qué clase de inteligencia o temperamento puede suponerse que toda esta gente pueda tener en común? Deben ser muy raros los investigadores "obligados" y la mayor parte de los investigadores podría, en cambio, haber sido cualquier otra cosa.

PETER P. MEDAWAR

The art of the soluble. Creativity and originality in science. Methuen, London, 1967.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 19-24 (1981)

PROPIEDADES DE LAS PARTICULAS INTERFERENTES GENERADAS POR EL VIRUS JUNIN EN CELULAS VERO

GUILLERMINA I. HELP, CELIA E. COTO *

Cátedra de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

En trabajos anteriores [5, 6], hemos demostrado que en sublíneas de células Vero infectadas persistentemente con virus Junin, se sintetizan partículas interferentes que se liberan al sobrenadante. Estas partículas son capaces de interferir con las actividades citolíticas del virus estándar, tanto en ensayos in vitro como en infecciones in vivo [5, 6], actuando como factor regulador de la virulencia. Posteriormente se encontró [6] que estas partículas no sólo se producen durante la infección persistente, sino que se pueden detectar durante la infección primaria (aguda) de las células Vero, donde se generan junto con el virus estándar citolítico. Asimismo, se vio que se favorece su síntesis realizando pasajes seriados de virus a alta multiplicidad de infección en cultivos celulares [6] y en ratón lactante [7]. El objetivo de este trabajo fue estudiar algunas propiedades de las partículas interferentes de virus Junin originadas por pasajes sucesivos en células Vero.

Material y métodos

Virus: se utilizó la cepa de virus denominada $XJCl_3$ [4] que se mantuvo en el laboratorio por pasajes en cerebro de ratón lactante.

Células: se trabajó con la línea de células Vero (riñón de mono verde africano) entre los pasajes 150 y 300. El medio de crecimiento fue HLS [7] con 6 % de suero de ternera inactivado y 50 μg/ml de gentamicina. Para el mantenimiento de los cultivos se utilizó MEM (Medio Esencial Mínimo) con 3 % de suero bovino y 50 μg/ml de gentamicina.

Inducción de partículas interferentes: Se hicieron pasajes sucesivos de virus Junin en cultivos celulares a alta multiplicidad de infección, para lo cual se inocularon 2 x 10^6 células Vero a una multiplicidad de 10 UFP/célula. Luego de 2 h a 37° C se descartó el inóculo, las células se lavaron con solución reguladora salina fosfatada (PBS) y se cubrieron con medio de mantenimiento. Al tercer día se cosechó el sobrenadante, que se denominó CT_1 (cultivo de tejidos, pasaje nº 1), se centrifugó a baja velocidad y una alícuota se utilizó como inóculo para preparar el siguiente pasaje concentrado CT_2, y así sucesivamente hasta llegar a CT_{12}.

Titulación de virus: La infectividad viral se determinó por el método de titulación de placas bajo agar [3].

Determinación de la actividad interferente: Se hizo de acuerdo a un método ya publicado [7] que consiste en calcular la inhibición que se produce en la multiplicación del virus Junin cuando un cultivo previamente inoculado con el material interferente se desafía con una determinada dosis de virus estándar.

Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ A.I.} = \frac{E - I}{E} \times 100$$

donde:

A.I. : actividad interferente;

E : rendimiento del virus estándar inoculado solo;

— — — —

Recibido: 8-X-1980. Aceptado: 15-X-1980.

* Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Dirección postal: Cátedra de Virología, Departamento de Química Biológica, Pabellón 2, piso 4º, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina.

I : rendimiento del virus estándar en células preinoculadas con el material interferente.

Inhibición de la actividad interferente: Una alícuota del stock concentrado CT_6 se mezcló en partes iguales con suero humano de convalesciente de Fiebre Hemorrágica Argentina, diluido al 20 % (índice de neutralización 10^7 respecto de la cepa homóloga) y se incubó durante 1 h a 37° C. Una vez finalizada la incubación, la mezcla se inoculó en cultivos de células Vero, que 1 h más tarde fueron lavados y desafiados con 1 x 10^5 UFP de virus Junin a fin de determinar la actividad interferente del material tratado. Paralelamente se hicieron dos conltroles con CT_6 sin inmunosuero, manteniéndolos durante 1 h uno a 0º C y el otro a 37º C.

Irradiación del material interferente: El stock concentrado CT_6 y un stock de virus preparado en cultivo de tejidos según el método de rutina (a baja multiplicidad de infección), se diluyeron en solución salina y se colocaron en cajas de Petri. La irradiación se hizo con una lámpara germicida de 15 watts, marca Phillips, en una cámara oscura a 10 cm de distancia durante 5 min con agitación. Simultáneamente, como controles se dejaron una alícuota de virus y otra de CT_6 durante 5 min a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tratamiento, se taparon las cajas y el stock CT_6 irradiado y su control, se ensayaron según la técnica descripta anteriormente para la determinación de actividad interferente. El virus estándar tratado paralelamente y su control se titularon por el método de formación de placas bajo agar, para determinar la pérdida de infectividad sufrida a consecuencia de la irradiación.

Resultados

Inducción de partículas interferentes de virus Junin en células Vero: En la Tabla 1 se presentan los datos obtenidos en relación a la infectividad y actividad interferente de los sobrenadantes de CT_0 a CT_{12}. En cuatro pasajes sucesivos (CT_0 a CT_4) la infectividad viral decae en 7 unidades logarítmicas, no siendo posible detectar virus infeccioso en CT_5, CT_6 y CT_7. Sin embargo, el virus infectivo reaparece, aunque en títulos muy bajos, en otro ciclo que abarca los pasajes CT_8, CT_9 y CT_{10}. Paralelamente a la caída de la infectividad se produce un incremento en la actividad interferente (CT_3 en adelante), que presenta también dos ciclos de producción desfasados en relación a los anteriores, mostrando una dependencia de la síntesis de partículas interferentes con la formación de viriones.

TABLA 1. — ***Variaciones en el nivel de infectividad e interferencia en los sucesivos pasajes concentrados en células Vero***

Pasaje Nº CT	Infectividad UFP/ml	Interferencia %
0 *	5.0 x 10^8	—
1	5.5 x 10^4	0
2	1.7 x 10^4	0
3	3.5 x 10^3	50
4	6.5 x 10^1	60
5	<5	75
6	<5	80
7	<5	32
8	9.0 x 10^1	39
9	4.5 x 10^1	0
10	2.3 x 10^1	50
11	<5	60
12	<5	80

* Inóculo.

Variación de la interferencia en función de la concentración relativa de partículas interferentes: De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 1, el stock del pasaje CT_6 presentó la máxima actividad interferente y no resultó infeccioso, por lo cual se decidió utilizarlo para estudiar algunas propiedades de las partículas interferentes.

En primer lugar, se analizó el efecto que producía la dilución creciente de CT_6 sobre su actividad interferente. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 1.

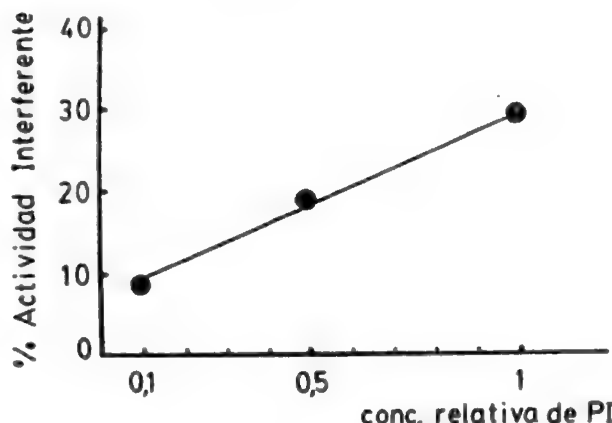


Fig. 1. — Relación entre la concentración relativa de partículas interferentes del stock CT_6 y su capacidad de interferencia.

La dilución de CT_6 produce una pérdida proporcional de actividad interferente, lo cual indica que existe una relación directa entre la cantidad de partículas interferentes inoculadas y la capacidad de producir interferencia.

La relación lineal entre los parámetros graficados muestra que es suficiente la in-

fección de una célula con una partícula interferente para inhibir la multiplicación del virus estándar en la misma.

Especificidad de las partículas interferentes: En general, las partículas interferentes de todos los virus presentan la característica de poseer el mismo complemento proteico que el virus estándar [8]. Para corroborar la especificidad de las partículas inducidas en nuestro sistema, se procedió a determinar si su capacidad de interferencia era inhibida por un suero de convaleciente anti-Junin.

Los resultados de la Tabla 2 muestran que el calentamiento de CT_6 durante 1 h a 37° C no afecta sensiblemente su capacidad interferente, la cual es completamente neutralizada por el inmunosuero anti-Junin. La especificidad de esta inhibición permite concluir que la interferencia es producida realmente por partículas defectivas de este virus.

TABLA 2. — *Inhibición de la actividad interferente con inmunosuero anti-Junin*

Material inoculado	Rendimiento * (UFP/ml)	Interferencia %
MEM	2.2×10^3	0
CT_6 (1 h a 0° C)	5.3×10^2	76
CT_6 (1 h a 37° C)	6.5×10^2	70
CT_6 + Inmunosuero	2.2×10^3	0

* Antes del desafío con 1×10^5 UFP del virus estándar, los cultivos se lavaron exhaustivamente a fin de eliminar restos de inmunosuero.

Ensayo de filtración del agente interferente: En consideración a que el agente interferente podría tratarse de una proteína soluble, se procedió a filtrar el stock CT_6 a través de membranas Millipore.

Los datos de la Tabla 3 indican que la actividad interferente está asociada a partículas con un tamaño mínimo aproximado superior a los 50 mμ de diámetro.

TABLA 3. — *Determinación aproximada del tamaño del agente interferente*

Material inoculado	Rendimiento * (UFP/ml)	Interferencia %
MEM	6.6×10^3	0
CT_6	2.4×10^3	64
CT_6 filtrado x 220 mμ	2.5×10^3	62
CT_6 filtrado x 50 mμ	7.0×10^3	0

* Los cultivos se desafiaron con 1.2×10^5 UFP/botella.

Sensibilidad de la actividad interferente a la irradiación con luz ultravioleta: Con el objeto de comparar el grado de sensibilidad a la irradiación con luz UV de las partículas interferentes y las partículas infecciosas, se procedió a irradiar una muestra de un stock de virus estándar y del stock CT_6. Se eligió un tiempo de irradiación de 5 min basándonos en datos anteriores de la sensibilidad del virus Junin al UP [10], de modo de trabajar en condiciones en que la infectividad se encuentra seriamente afectada.

De los datos de la Tabla 4 se deduce que una dosis de radiación capaz de inactivar al virus en más de 5 logaritmos no afecta a la actividad interferente.

Discusión

La facilidad con que se producen partículas interferentes de virus Junin por

TABLA 4. — *Sensibilidad de las partículas interferentes a la luz UV*

Material inoculado	Rendimiento * (UFP/ml)	Título (UFP/ml)	Interferencia %	Inactivación %
MEM	2.2×10^3	—	0	—
CT_6 (sin irradiar)	5.3×10^2	—	76	—
CT_6 (irradiado)	6.7×10^2	—	70	—
$XJCl_3$ (sin irradiar)	—	2.7×10^5	—	0
$XJCl_3$ (irradiado)	—	< 5	—	> 99.998

* Se desafió con 1×10^5 UFP de virus Junin/cultivo

pasajes seriados concentrados en células Vero, se evidencia claramente en los datos registrados en la Tabla 1. De un título de virus de 10^8 UFP/ml presente en el inóculo inicial proveniente de cerebro de ratón, se obtiene un valor de 10^4 UFP/ml luego del primer pasaje por cultivo. Como los stocks concentrados se cosecharon al 3er. día pi, momento en el cual se produce el rendimiento máximo de virus en células Vero [1], el descenso de 4 unidades logarítmicas no se puede atribuir a este factor. Una interpretación más adecuada de este hecho, sería que en el inóculo utilizado existieran partículas interferentes preformadas en cerebro de ratón, y que luego de los primeros ciclos de replicación del virus estándar en los pasajes CT_1 y CT_2 se amplificara su número.

Aunque es muy difícil poder determinar la presencia de partículas interferentes en los stocks de alto título de virus, se sabe que en las infecciones a alta multiplicidad (50-100 UFP/cél) no hay una respuesta lineal dosis-efecto [2], evidenciándose un fenómeno de autointerferencia. Por otra parte, se ha demostrado que también es posible inducir la síntesis de estas partículas en cerebro de ratón [7]. El hecho que la actividad interferente se detecte recién en el pasaje 3, se puede atribuir a que ésta se manifiesta una vez que la concentración de partículas alcanza un nivel suficiente como para ocasionar una inhibición del virus estándar estadísticamente significativa.

La producción cíclica y ligeramente desfasada de virus estándar y de virus interferente, es un fenómeno común que se presenta en todos los sistemas virales generadores de partículas interferentes [8]. Siempre se necesita un nivel óptimo de virus estándar para permitir la síntesis del interferente; esto provoca una competencia entre ambos que favorece al interferente, hasta que la inhibición que origina repercute sobre su propia síntesis.

Llama la atención el alto grado de resistencia de la actividad interferente a la irradiación con luz UV. Este fenómeno no sólo lo presenta el virus Junin, sino que se ha encontrado en otros Arenavirus [13, 14], y estaría indicando que la región del genoma responsable de la interferencia es muy pequeña, en relación a la que controla la infectividad. Como estos virus tienen un genoma segmentado [11], podría ocurrir que al igual que las partículas interferentes del virus Influenza [9] las del virus Junin poseyeran un pequeño RNA. Si consideramos que en este RNA se encuentra el locus responsable de la interferencia, esto explicaría la resistencia observada frente a la irradiación.

Los resultados de la filtración e incubación con inmunosuero específico, señalan que la interferencia está asociada a partículas que poseen una estructura proteica similar a la del virus estándar. Las partículas defectivas de los Arenavirus han sido caracterizadas parcialmente, debido a la dificultad que representa separarlas de las estándar. Welsh y col. [15], utilizando como fuente de partículas interferentes los sobrenadantes de líneas persistentemente infectadas con LCM, han encontrado una mayor heterogeneidad en la densidad de estas partículas (1.15-1.17 gr/cm^3) que en la del virus estándar (1.17 gr/cm^3), lo cual permitiría en sucesivas etapas una separación exitosa de ambas.

El empleo de pasajes seriados concentrados en cultivos celulares como se describen en este trabajo, no ha sido una metodología aplicada para inducir partículas interferentes en el caso de los Arenavirus, existiendo sólo una referencia a la misma para LCM [12]. La desventaja de este proceso en relación al uso de sobrenadantes de líneas persistentemente infectadas, reside en la dificultad que representa eliminar el virus estándar de las preparaciones del interferente, ya que aquél podría falsear los resultados obtenidos. En nuestro caso, sólo hemos realizado una caracterización parcial de las partículas interferentes de virus Junin originadas por pasajes concentrados, motivo por el cual no podemos afirmar que sean idénticas a las que se liberan espontáneamente al medio extracelular en células Vero infectadas persistentemente con este virus [5], aunque, al igual que aquéllas, son inhibidas por inmunosuero y retenidas por filtros de 50 $m\mu$ de diámetro, no son patógenas para ratón lactante, no producen ACP o placas, e interfieren con todas las actividades citolíticas del virus estándar.

Resumen

Los pasajes seriados concentrados de virus Junin en células Vero provocan la síntesis de partículas capaces de interferir con la multiplicación del virus parental in vitro. La inoculación sucesiva del virus a alta multiplicidad de infección, produce una disminución considerable de su infectividad con el consiguiente incremento de actividad interferente, de tal modo que ambas variables presentan una evolución cíclica y desfasada. Para caracterizar las partículas defectivas así generadas, se sometió el 6º pasaje concentrado de virus Junin al tratamiento con inmunosuero específico, a la irradiación con luz UV y a una filtración por membranas con poros de distintos diámetros. Los resultados obtenidos señalan que la interferencia está asociada a elementos particulados cuya alta resistencia a la luz UV sugiere un genoma funcional más pequeño, pero que poseen los antígenos propios del virus estándar. La curva dosis-respuesta indica que es suficiente la infección de una célula con una única partícula interferente para inhibir la replicación del virus estándar en ella. Las propiedades son similares a las que presentan las partículas interferentes sintetizadas en líneas persistentemente infectadas con virus Junin, a pesar de lo cual no podemos afirmar que sean idénticas, dado que se requiere una purificación exhaustiva de las mismas a fin de separarlas de los viriones estándar, antes de someterlas a un estudio físicoquímico más detallado.

Summary

PROPERTIES OF JUNIN VIRUS INTERFERING PARTICLES GENERATED IN VERO CELLS.

Non infectious Junin virus interfering particles (IP) are easily induced in Vero cells by serial undiluted viral passages. The presence of IP in virus harvests is recognized by their ability to depress standard virus multiplication in an in vitro coinfection assay. Results of Table 1 show that after three successive passages viral infectivity dropped 5 logs whereas the interfering activity rose to a maximum. After that, a cyclical interdependent pattern of both standard virus production and IP is observed, as found in many other viral systems. The dose-response curve of IP activity (Fig. 1) indicates that one IP is sufficient to inhibit standard virus multiplication in the same cell. Interference activity is associated with particles retained by filters of 50 mμ (Table 3) and it is abolished by incubation with immune sera raised against Junin virus showing that both particles share antigenic determinants. IP display an unusual resistance to UV irradiation compared with the sensitivity of standard virus. A UV dose that inactivates viral infectivity almost completely does not affect interference activity (Table 4). The experiments reported here demonstrate that at least, two kinds of virus particles are synthesized in Vero cells infected with Junin virus: standard infections and non-infectious interfering particles. The fact that the latter appeared so fast, only after a few passages, suggests that despite the cytocydic effect of Junin virus for Vero cells the infection behaves mainly as an abortive one.

Bibliografía

1. Coto CE, de Vombergar MD: The effect of 5-Iododeoxyuridine and Actinomycin D on the multiplication of Junin virus. *Arch Ges Virusforsch* 27: 307, 1969.
2. Coto CE, León ME, Help GI: Rol del genoma del huésped en la multiplicación del virus Junin (FHA). *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 9: 247, 1975.
3. Damonte EB, Coto CE: Análisis de los factores que condicionan la formación de placas en células Vero infectadas con los virus Junin y Tacaribe. *Rev Asoc Arg Microbiol* 6: 15, 1974.
4. Guerrero LB de, Weissenbacher MC, Parodi AS: Inmunización contra la Fiebre Hemorrágica Argentina con una cepa atenuada del virus Junin. I. Estudio de una cepa modificada del virus Junin. Inmunización de cobayos. *Medicina (Bs Aires)* 29: 1, 1969.
5. Help GI, León ME, Coto CE: Interferencia asociada a los cultivos celulares crónicamente infectados con virus Junin. *Rev Asoc Arg Microbiol* 8: 45, 1976.
6. Help GI: Biogénesis de partículas interferentes y su posible rol en las infecciones con virus Junin. Tesis Doctoral, Buenos Aires, 1980.
7. Help GI, Coto CE: Génesis de partículas interferentes durante la multiplicación del virus Junin in vivo. *Medicina (Bs Aires)* 40: 531, 1980.

8. Huang AS, Baltimore D: Defective interfering animal viruses. *Comprehensive Virology,* editado por H. Frankel-Conrat y R. Wagner, Plenum Press, New York, vol 10, cap 2: 73, 1977.
9. Nakajima K, Ueda M, Sugiura A: The origin of small RNA in Von Magnus particles of Influenza virus. *J Virol* 29: 1142, 1979.
10. Parodi AS, Coto CE, Boxaca M, Lajmanovich S, Gonzales S: Characteristics of Junin virus, etiological agent of Argentine Hemorrhagic Fever. *Arch Ges Virusforsch* 19: 393, 1966.
11. Pedersen IR: Different classes of ribonucleic acid isolated from lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 11: 416, 1973.
12. Popescu M, Schaefer H, Lehmann-Grube F: Homologous interference of LCM virus. Detection and measurement of interference focus-forming units. *J Virol* 20: 1, 1976.
13. Staneck LD, Pfau CJ: Interfering particles from a culture persistently infected with Parana virus. *J Gen Virol* 22: 437, 1974.
14. Welsh RM, O'Connell CM, Pfau CJ: Properties of defective lymphocytic choriomeningitis virus. *J Gen Virol* 17: 355, 1972.
15. Welsh RM, Burner PA, Holland JJ, Oldstone MBA, Thompson HA, Villareal LP: A comparison of biochemical and biological properties of standard and defective lymphocytic choriomeningitis virus. *Bull WHO* 52: 403, 1975.

— — — —

There is nothing in experimental science that calls for great feats of ratiocination or a preternatural gift for deductive reasoning. Common sense one can not do without and one would be the better for owning some of those old-fashioned virtues that seem unaccountably to have fallen into disrepute. I mean application, diligence, a sense of purpose, the power to concentrate, to persevere and not be cast down by adversity.

Nada hay en la ciencia experimental que requiera grandes dotes para razonar o una capacidad sobrenatural para el razonamiento deductivo. No podemos dejar de tener sentido común y nos convendrá poseer algunas de estas virtudes antaño de moda, y que inexplicablemente parecen haber perdido su importancia. Me refiero a la aplicación, diligencia, motivación, el poder de concentrarse, perseverar y no deprimirse por la adversidad.

P. B. MEDAWAR

Advice to a young scientist, Harper Row, 1979

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 25-34 (1981)

PROTECCION INDUCIDA EN COBAYO POR LA VARIANTE XJ_0 DEL VIRUS JUNIN

MARTHA C. BOXACA *, LUCIA B. DE GUERRERO *, ELBA L. WEBER **, ESTER MALUMBRES

Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La necesidad de contar con una vacuna contra la FHA para proteger no sólo a la población naturalmente expuesta a la infección, sino también a otros grupos de alto riesgo, como las personas que trabajan en los laboratorios donde se manipulan materiales infectados con el virus, es ampliamente reconocida. De aquí surge la importancia del estudio de diferentes cepas atenuadas del virus Junin que tengan perspectivas de ser empleadas para tal fin. En trabajos anteriores [1, 12, 14, 16, 17, 19], se han presentado evidencias que demuestran que es posible estimular una respuesta inmunológica duradera mediante la inoculación de la cepa atenuada $XJCl_3$ del virus Junin, tanto en modelos experimentales como en el hombre. Los estudios efectuados hasta el momento con una variante de la cepa prototipo XJ llamada XJ_0, cuya procedencia e historia de pasajes fuera oportunamente presentada [4,11], demostraron que tiene un comportamiento y grado de atenuación similares a la cepa $XJCl_3$. En base a estos resultados consideramos que dicha variante se perfila como una buena candidata para obtener mediante su clonado en sustratos adecuados, una cepa más apropiada que la $XJCl_3$ para ser usada en la profilaxis de la FHA. Es por esto que consideramos que, simultáneamente con el programa tendiente a obtener y analizar clones de la variante XJ_0, es de fundamental importancia continuar con el estudio de los distintos aspectos antigénicos e inmunopatológicos de la XJ_0. En este trabajo empleando nuevamente el modelo cobayo se evaluó la capacidad antigénica de la variante XJ_0 y la evolución de la protección estimulada, en función del tiempo y de la dosis infectante.

Material y métodos

Virus: Se emplearon los siguientes stocks: Junin cepa XJ, prototipo, con 4 pasajes por cobayo y 16 por ratón lactante, título $10^{7.3}$ $DL_{50}/100$ mg; Junin variante XJ_0, atenuada [11] con dos pasajes por cobayo y 19 por ratón lactante, título $10^{8.2}$ $DL_{50}/100$ mg y Junin cepa $XJCl_3$, atenuada, con cinco pasajes por ratón lactante después del clonado, título $10^{8.3}$ $DL_{50}/100$ mg. Los stocks fueron homogeneizados de cerebro de ratón lactante inoculados, preparados y titulados según técnicas ya detalladas [2]. Como control se usó un homogeneizado de cerebro de ratón normal (CRN) de 9 días de edad, preparado siguiendo el mismo procedimiento que para los stocks de virus.

Animales: Cobayos de exocría de 300-350 g que fueron inoculados por vía im con 0.2 ml en la pata posterior izquierda y controlados por peso durante todo el período experimental. Ratones cepa Rockland de 2 ó 3 días de vida, provenientes de

— — — —

Recibido: 22-VIII-1980. Aceptado: 3-X-1980.

* Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Miembro de la Carrera del Personal de Apoyo a la Investigación, CONICET.

Dirección postal: Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina.

una colonia cerrada mantenida en la Cátedra, inoculados por vía ic.

Células: Vero, entre los pasajes 230-250. Se emplearon cultivos confluentes preparados en tubos de ensayo [5].

Diseño experimental: Los cobayos se distribuyeron en 3 grupos, el grupo I estuvo constituido por 6 lotes de 10 a 16 animales que fueron inoculados, respectivamente, con 10^3 a 10^{-2} DL_{50} de XJ y por un lote control de 5 animales. El grupo II estuvo formado por 8 lotes de 10 cobayos que fueron inoculados, respectivamente, con 10^6 a 10^{-1} DL_{50} de XJ_0 y un lote de 10 cobayos como control. Por su parte el grupo III estuvo integrado por 93 cobayos divididos en 10 lotes que fueron inoculados simultáneamente con 10^3 DL_{50} de XJ_0 y un lote de 50 cobayos como control. Los lotes controles fueron inoculados al mismo tiempo que los respectivos lotes experimentales con 0.2 ml de una dilución 10^{-3} de CRN.

Los cobayos sobrevivientes de los grupos I y II fueron desafiados con 10^2 DL_{50} de Junin XJ por vía im a los 37 días pi, simultáneamente con 5 animales de sus respectivos controles.

Los cobayos del grupo III fueron desafiados con la misma dosis, vía y cepa de virus empleada para los grupos I y II, pero a los 0, 3, 6, 9, 12, 15, 21, 30, 60 y 90 días pi, usándose por cada fecha un lote constituido por 8 cobayos infectados y 4 controles.

En los 3 grupos los animales fueron sangrados por punción cardíaca inmediatamente antes y 45 días después del desafío, momento en que se dio por terminado el período de observación. Los sueros de cada animal fueron fraccionados y guardados a $-20°$ C.

Mortalidad y aislamiento de virus: Todos los cobayos muertos fueron autopsiados tan rápidamente como fue posible registrándose los signos anatomopatológicos macroscópicos. De aquellos que murieron antes de recibir la dosis desafío y cuya autopsia pudo realizarse dentro de las 2 horas de producida su muerte, se sacaron órganos (hígado, bazo, pulmón y ganglios) con los que se preparó un homogeneizado al 10 % que se mantuvo a $-70°$ C. A partir de este material se intentó el aislamiento de virus en ratones siguiendo el esquema descripto anteriormente [11]. Los virus aislados fueron tipificados por neutralización en cultivos celulares frente a suero humano anti-FHA.

Serología: La titulación de anticuerpos neutralizantes (Nt) se realizó en cultivos de células Vero por la técnica de virus constante (10^2 $DICT_{50}$ de la cepa $XJCl_3$) frente a diluciones seriadas de suero en base 2 [13] y la de los anticuerpos fijadores de complemento (FC) por microtécnica en placas empleando un antígeno preparado con la cepa Junin $XJCl_3$, según la técnica de Clark y Casals [6].

Resultados

Mortalidad y dosis infectante: La titulación comparativa de los stocks XJ (grupo I) y XJ_0 (grupo II) permitió poner en evidencia algunas diferencias importantes. Los títulos alcanzados, que se calcularon en base a la mortalidad observada en cada grupo hasta los 37 días pi, fueron $10^{7.7}$ para XJ y $10^{3.5}$ para XJ_0 expresado como DL_{50}/100 mg.

Esta diferencia no se manifestó en ratón lactante donde los títulos fueron prácticamente del mismo orden, $10^{7.3}$ y $10^{8.2}$ DL_{50}/100 mg para XJ y XJ_0, respectivamente (Tabla 1).

TABLA 1. — *Titulación comparativa de XJ y XJ_0 en cobayo*

Inóculo (DL_{50} ratón)	XJ_0			XJ		
	M/T	% M	DM	M/T	% M	DM
10^6	7/10	70	20.6	—		
10^5	4/10	40	21.8	—		
10^4	3/10	30	21	—		
10^3	3/10	30	23	14/14	100	13.8
10^2	1/10	10	28	14/14	100	14.3
10	1/10	10	24	14/14	100	15.8
1	0/10	0		11/14	78	19.8
10^{-1}	0/10	0		2/10	20	22
10^{-2}	—			0/10	0	
Título en cobayo		$10^{3.5}$			$10^{7.7}$	
Título en ratón		$10^{8.2}$			$10^{7.3}$	

Todos los cobayos fueron inoculados simultáneamente por vía im. Los títulos que se expresan como DL_{50}/100 mg de órgano, se calcularon por el método de Reed y Muench. Para XJ_0 10^6 DL_{50}/0.2 ml se obtuvieron mediante una dilución $10^{-1.5}$ del stock, y para XJ 10^3 DL_{50}/0.2 ml con una dilución $10^{-3.6}$; M/T: número de cobayos muertos/número de cobayos inoculados; % M: por ciento de mortalidad; DM: promedio del día de muerte pi.

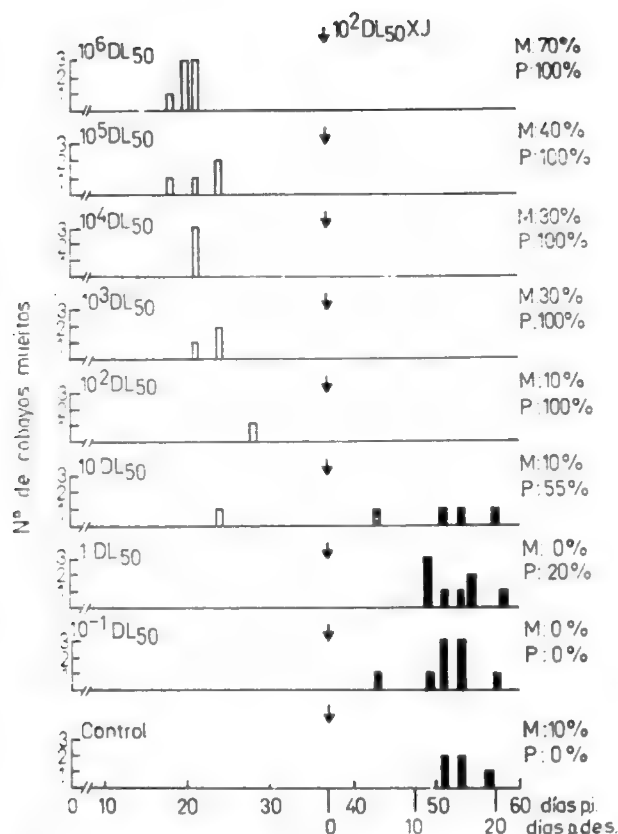


Fig. 1. — Distribución de las muertes ocurridas antes (barras vacías) y después del desafío (barras llenas) en lotes de cobayos infectados por vía im con 10^6 a 10^{-1} DL_{50} de la variante XJ_0 del virus Junin y desafiados a los 37 días pi con 10^2 DL_{50} de la cepa patógena XJ (grupo II). En la columna de la derecha se consigna para cada dosis de XJ_0 empleada, el por ciento de mortalidad (M) calculado en base a las muertes ocurridas antes del desafío, y el por ciento de protección (P) establecido de acuerdo con el número de animales que sobrevivieron al desafío. El grupo control, 5 animales, fue inoculado en el tiempo 0 con una dilución 10^{-3} de CRN y desafiado simultáneamente con los lotes experimentales.

En el grupo I las muertes se produjeron entre los 12 y 24 días pi, pudiéndose establecer un incremento en el promedio del día de muerte con la disminución de la dosis infectante (Tabla 1), lo que concuerda con observaciones anteriores [15]. En este grupo todos los animales que murieron presentaron los signos hemorrágicos característicos de la fiebre hemorrágica experimental en cobayo (FHE) [10].

En los cobayos infectados con distintas dosis de la variante XJ_0 (grupo II), las muertes se produjeron comparativamente más tarde, entre los 18 y 28 días pi, observándose un retardo de aproximadamente 10 días en el promedio de día de muerte con respecto a la misma dosis infectante de XJ. Por otra parte, aunque el número de animales muertos por XJ_0 fue escaso, parecería observarse también una tendencia a prolongar el promedio de día de muerte con la disminución de la dosis infectante (Tabla 1 y Figura 1). Es importante señalar que ninguno de los 19 animales muertos en este grupo presentó signos hemorrágicos, observándose en 6 un cuadro congestivo, en 3 un contenido ligeramente hemorrágico en el tracto gastrointestinal, en tanto que los 10 restantes no mostraron particularidades. No fue posible establecer ninguna correlación entre el conjunto de signos anatomopatológicos macroscópicos y el número de dosis infectantes.

En 13 de estos 19 animales muertos espontáneamente se intentó aislar virus de órganos, siguiendo el esquema indicado en Material y métodos que ha demostrado ser el más adecuado para estos casos. Sólo se pudieron concretar 2 aislamientos: uno correspondiente al lote infectado con 10^6 DL_{50} y otro al infectado con 10^5 DL_{50}. Los restantes intentos (de 4, 3, 1, 2 y 1 animales correspondientes a los lotes inoculados con 10^6, 10^5, 10^4, 10^3 y 10 DL_{50} respectivamente), fueron negativos.

Sobrevida y protección: En el grupo I (XJ) sólo sobrevivieron animales pertenecientes a los lotes inoculados con 1 a 10^{-2} DL_{50}, en tanto que en el grupo II (XJ_0) hubo sobrevivientes en todos los lotes (Tabla 1). Para evaluar la relación sobrevida-protección, todos los animales fueron desafiados a los 37 días pi con la cepa patógena XJ, simultáneamente con sus respectivos lotes controles. La totalidad de los cobayos que sobrevivieron del grupo I, murieron entre los 13 y 18 días post-desafío (pd) con signos típicos de FHE, lo que concuerda con el comportamiento observado reiteradamente en este huésped cuando se lo infecta con la cepa prototipo. Los tiempos de muerte coincidieron con los de los controles, en cambio entre los animales sobrevivientes a la inoculación con XJ_0 (grupo II) sólo se produjeron muertes pd en los lotes primo infectados con 10 DL_{50} o menos, siendo las mortalidades respectivas: 45 % (10 DL_{50}), 80 % (1 DL_{50}) y 100 % (10^{-1} DL_{50}). Con excepción de 2 cobayos que murieron a los 6 días pd (1 y 10^{-1} DL_{50}), el resto de las muertes también ocurrieron dentro del mismo período, 13 a 20 días pd, superponiéndose con las de los controles. Sin embargo,

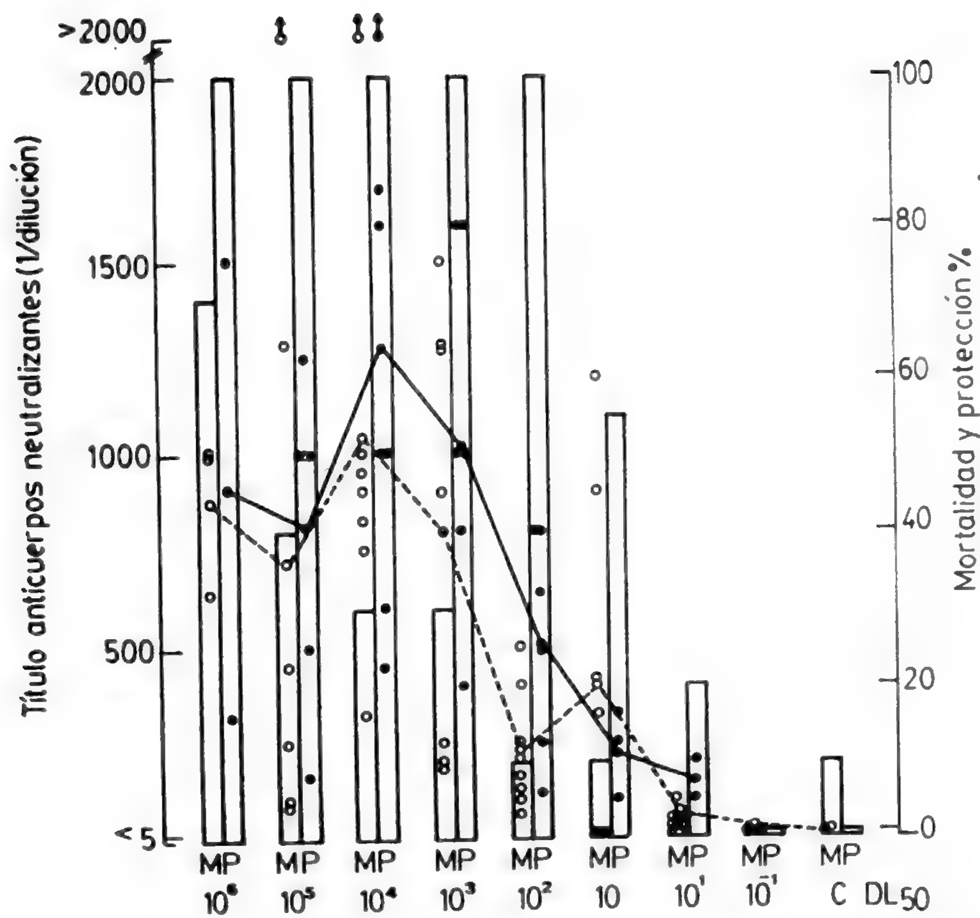


Fig. 2. — Títulos de anticuerpos Nt inducidos por las DL_{50} de virus Junin XJ_0 indicadas en la abscisa, a los 37 días pi (muestra predesafío) y a los 45 pd (muestra post-desafío). Los valores individuales pre (O) y post (●) desafío se expresan como la inversa de la dilución. La línea cortada une los títulos promedios predesafío y la línea llena los títulos promedio post-desafío. Las barras indicadas en la abscisa con M representan el por ciento de mortalidad, y las señaladas con P, el por ciento de protección, para cada lote-dosis. Los datos corresponden al grupo II.

cabe señalar que en los 4 animales muertos del lote 10 DL_{50}, en 2 del lote 1 DL_{50} y en 2 del lote 10^{-1} DL_{50}) sólo se encontró un cuadro de congestión generalizada apareciendo signos de FHE en los 14 animales restantes (lotes 1 y 10^{-1} DL_{50}).

En la Figura 2 se consignan los títulos de anticuerpos neutralizantes (Nt) individuales y promedio obtenidos para cada lote del grupo II a los 36 días pi, muestra predesafío, y a los 82 días pi (45 días pd) acompañados por los correspondientes valores de mortalidad y protección. Como puede observarse, a los 36 días pi todos los animales que sobrevivieron a la inoculación de 10^6 a 10^2 DL_{50} de XJ_0 tuvieron anticuerpos Nt. El título promedio para los Nt fue prácticamente el mismo en los 4 primeros lotes (1 : 880, 1 : 700, 1 : 1040 y 1 : 800), observándose una acentuada dispersión de los valores, en tanto que en los cobayos del lote 10^2 DL_{50} tanto el valor promedio (1 : 220) como las variaciones individuales disminuyeron sensiblemente. La totalidad de los animales de estos 5 lotes sobrevivió al desafío. En 4 de los cobayos que recibieron 10 DL_{50}, no se detectaron anticuerpos Nt y murieron como consecuencia del desafío aunque sin signos de FHE, mientras que en los restantes se encontraron títulos equivalentes a los hallados con dosis infectantes mayores (1 : 400 a 1 : 1200) y sobrevivieron al desafío. En el lote infectado con 1 DL_{50} 5 animales presentaron títulos entre 1 : 20 y 1 : 100 y 2 fueron negativos, pero sólo sobrevivieron al desafío los 2 animales con mayor título de anticuerpos (1 : 100). Finalmente, en el lote infectado con 10^{-1} DL_{50} únicamente 3 animales desarrollaron anticuerpos Nt aun-

que en un nivel muy bajo (1 : 10 - 1 : 15), y todos sucumbieron a la dosis desafío, presentando signos hemorrágicos.

Los títulos promedio de anticuerpos Nt en las muestras tomadas a los 45 días pd, sólo mostraron un ligero incremento con respecto a las predesafío correspondientes acompañado de un aumento en la dispersión de los valores individuales. El análisis de las muestras pareadas señaló que en el 60 % el título aumentó en 1 o 2 diluciones, en el 23 % no varió y en el 17 % restante se produjo una disminución, no pudiéndose establecer relación entre variación y dosis primo infectante. En todas las muestras predesafío que presentaron anticuerpos Nt también se detectaron anticuerpos FC. Los niveles promedio para los distintos lotes fueron semejantes, con variaciones individuales entre 1 : 64 y 1 : 4. Estos anticuerpos persistieron en las muestras post-desafío, pero los títulos no alcanzaron valores superiores a 1 : 16.

Las curvas ponderales permitieron seguir la evolución de cada lote y reflejaron la influencia de la dosis infectante. En los lotes infectados con 10^6 y 10^5 DL_{50} se produjo un descenso de peso entre los 10 y 21 días pi, aunque en este último lote no fue tan marcado. En los lotes restantes el peso se mantuvo estable durante el mismo período. El desafío produjo un efecto inverso en las curvas ponderales, comprobándose un descenso entre los 1 y 6 días pd en los animales que sobrevivieron a 10^5 y 10^4 DL_{50} de XJ_0, que se hizo más marcado y prolongado con la disminución de la dosis primo infectante, hasta que en el lote infectado con 10^{-1} DL_{50} se observó un descenso constante semejante al del grupo control.

Evolución de la protección y respuesta humoral: La evolución de la protección inducida por la variante XJ_0 fue estudiada en base al número de muertes ocurridas en lotes de cobayos desafiados con la cepa patógena XJ a distintos tiempos después de la inoculación con una dosis constante de XJ_0, en las condiciones y tiempos descriptos en Materiales y métodos (grupo III).

En la Figura 3 se representa la distribución de las muertes en cada lote experimental y sus respectivos controles según el día de desafío, pudiéndose observar que en el lote desafiado en el día 0, es decir coincidiendo con la inoculación de XJ_0, todos los animales murieron, pero a partir del lote siguiente (desafío: 3 días pi) se observó un número cada vez menor de muertes que se redujeron a 0 en los animales desafiados desde los 60 días pi en más. Por su parte, todos los controles murieron como consecuencia de la infección con XJ entre los 12 y 20 días con el cuadro característico de la FHE. Los resultados anteriores señalan que si bien no se pudo detectar protección en el lote que recibió simultáneamente la dosis experimental y desafío, ésta se hizo evidente a

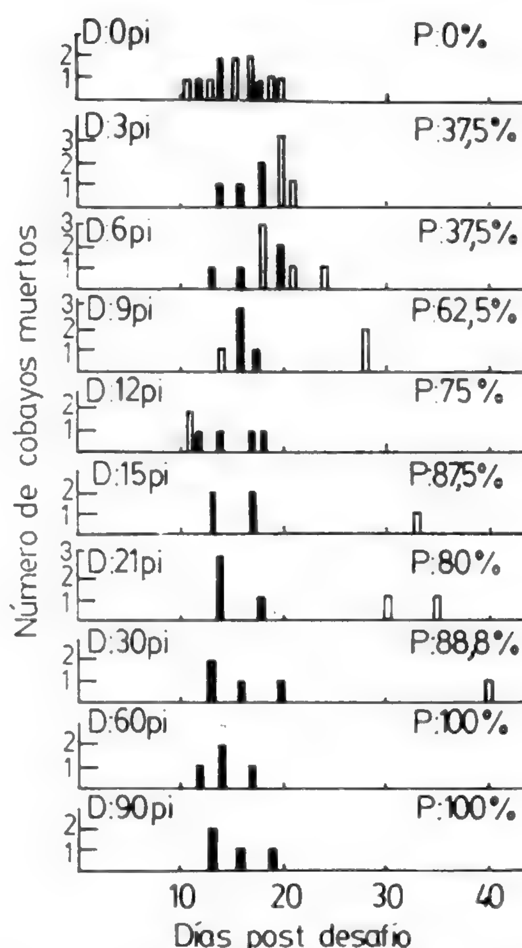


Fig. 3. — Distribución de las muertes de los cobayos del grupo III inoculados por vía im con 10^3 DL_{50} de la variante XJ_0 del virus Junín (barras vacías) y de sus respectivos controles (barras llenas), inoculados con una dilución 10^{-3} de CRN, desafiados con 10^2 DL_{50} de XJ por vía im entre los 0 y 90 días postinfección. En la columna de la derecha se consigna el por ciento de protección (P) calculado en base al número de animales infectados con XJ_0 que sobrevivieron al desafío.

los 3 y 6 días pi (37.5 %), alcanzando el 62.5 % a los 9 días pi, 75 % a los 12 días pi, 87.5 % a los 15 días pi, 75 % a los 21 días pi, 87.5 % a los 30 días pi y 100 % a los 60 y 90 días pi. También pudo observarse que el período de muerte de los cobayos del lote desafiado a los 0 días pi coincidió con el de los controles; en cambio en los lotes desafiados en fechas posteriores las muertes tendieron a producirse algo más tarde. Esta diferencia se hizo netamente significativa a partir del lote inoculado con XJ a los 15 días post XJ_0.

Las variaciones descriptas se reflejan en los signos anatomopatológicos macroscópicos observados. En todos los animales controles aparecieron las lesiones hemorrágicas características de la FHE, pero en el grupo experimental sólo fueron observadas en 5, 2, 1 y 1 cobayos correspondientes a los lotes desafiados en los días 0, 3, 6 y 21 pi, respectivamente. De los animales restante, 14 presentaron un cuadro congestivo y en 4 no se encontraron alteraciones macroscópicas evidentes.

En las muestras predesafío (Figura 4) los anticuerpos Nt comenzaron a detectarse a los 12 días pi en 3 de los 10 cobayos que integraron ese lote, con valores que oscilaron entre 1 : 10 y 1 : 30 ($\overline{X}$ 1 : 23), en tanto que desde el día 15 pi todos los animales fueron serológicamente positivos. A los 15 días pi los títulos individuales variaron entre 1 : 5 y 1 : 20 ($\overline{X}$ 1 : 11.5) y a los 21 días pi entre 1 : 5 y 1 : 30 (X 1 : 12), es decir que se mantuvieron dentro del mismo orden, experimentando un ligero aumento hacia los 30 días pi donde se encontraron títulos individuales de 1 : 10 a 1 : 190 ($\overline{X}$ 1 : 70). Este aumento se acrecentó a los 60 días pi con títulos individuales de 1 : 220 a 1 : 1550 ($\overline{X}$ 1 : 850), alcanzando a los 90 días los valores más altos (individuales entre 1 : 40 a 1 : 2560 y $\overline{X}$ 1 : 1100). El análisis de los datos serológicos obtenidos en las muestras tomadas a los 45 días pd (Figura 4), mostró un marcado ascenso de los anticuerpos Nt en los lotes que recibieron la cepa patógena entre los 3 y 30 días después de la infección con XJ_0, observándose también una mayor dispersión de los valores individuales para cada punto. Los valores promedio calculados fueron: 1 : 80, 1 : 550, 1 : 700, 1 : 980, 1 : 2010, 1 : 700 y 1 : 2400 para los lotes desafiados a los 3, 6, 9, 12, 15, 21 y 30 pi, respectivamente. En cambio, en los animales que recibieron el desafío a los 60 y 90 días post XJ_0 no se observó una respuesta secundaria, los títulos de anticuerpos disminuyeron o se mantuvieron, siendo los valores promedio para estos grupos 1 : 1000 y 1 : 250, respectivamente. Sólo en un ani-

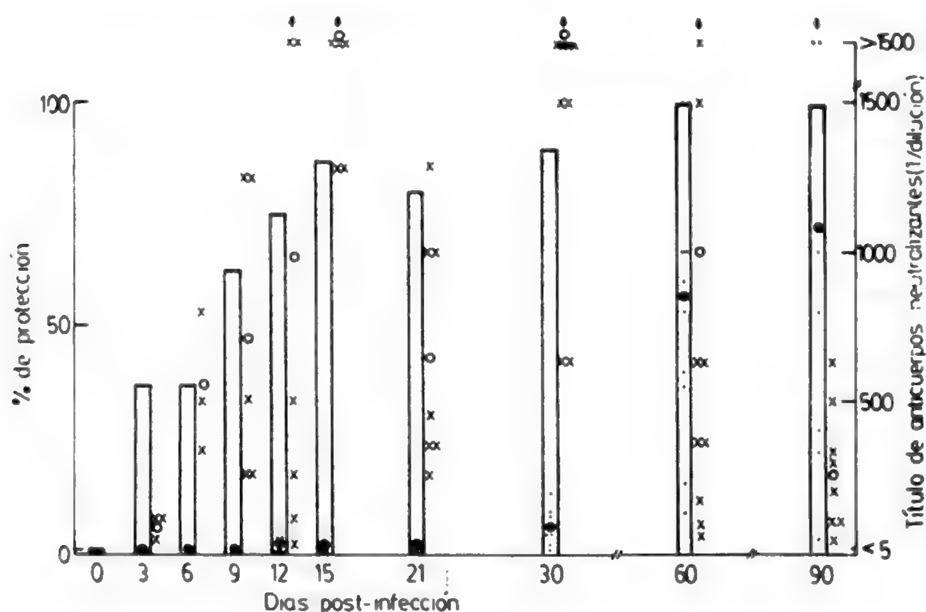


Fig. 4. — Títulos de anticuerpos Nt detectados en los cobayos del grupo III infectados en el tiempo 0 con 10^3 DL_{50} de XJ_0 y desafiados en los días pi indicados en la abscisa con 10^2 DL_{50} de XJ. Los títulos individuales (•) y promedio (●) de las muestras pre-desafío, así como los individuos (x) y promedio (O) de las post-desafío se expresan como la inversa de la dilución. Las barras representan el por ciento de protección para cada lote-día pi.

mal que a los 60 días pi mostró un título de 1 : 135 se produjo un aumento significativo en la muestra pd (1 : 1600).

Los anticuerpos FC fueron detectados entre los 15 y 21 días pi sólo en algunos animales, pero aparecieron en forma regular desde los 30 días pi. En las muestras post-desafío estos anticuerpos se presentaron en todos los animales salvo en los desafiados a los 90 días pi. Tanto en las muestras predesafío como en las post-desafío, los valores individuales fueron muy bajos, fluctuando para los primeros entre 1 : 4 a 1 : 16 y para los segundos entre 1 : 4 a 1 : 32.

Discusión

Los datos obtenidos en el modelo cobayo, que como ha sido demostrado reiteradamente es un marcador biológico de la atenuación de las cepas de virus Junin [1, 7, 11, 15] permitieron poner en evidencia la diferente capacidad letal, infectante y protectora de la variante XJ_0 con respecto a la cepa prototipo patógena XJ. Conociendo que en el ratón recién nacido el mecanismo patogénico es independiente de la virulencia de la cepa viral [3, 11], fue empleado para comparar en forma indirecta la patogenicidad de ambos stocks de virus en el cobayo. De los títulos de los stocks expresados como DL_{50} para ratón y cobayo (Tabla 1) fue posible inferir que para la cepa prototipo XJ, 1 DL_{50} ratón fue prácticamente igual a 1 DL_{50} cobayo, en tanto que para la variante atenuada fueron necesarias $10^{4.7}$ DL_{50} ratón para obtener 1 DL_{50} cobayo. Por otra parte, la capacidad infectante y protectora de la variante XJ_0 pudo calcularse a partir de los resultados presentados en la Figura 2. Considerando infectados a todos aquellos cobayos muertos o con conversión serológica para Junin antes de los 30 días pi, resultó que la DI_{50} fue $10^{8.2}/100$ mg lo que señalaría que en este caso fueron necesarias $10^{4.7}$ DI_{50} para obtener 1 DL_{50}. A su vez, la DP_{50} calculada sobre el número de animales sobrevivientes al desafío con la cepa XJ resultó igual a $10^{7.2}$, es decir 10 veces menor que la DI_{50} o, expresado de otra forma, 1 DL_{50} fue equivalente a $10^{4.7}$ DI_{50} y a $10^{3.7}$ DP_{50}.

La cepa XJ produjo un cuadro de mortalidad y protección enteramente diferente. En este caso sólo sobrevivieron los cobayos inoculados con las diluciones más altas, en los que no se detectó respuesta humoral, lo que señalaría que la DL_{50} fue equivalente a la DI_{50}. Estos cobayos murieron como consecuencia del desafío efectuado 30 días después, es decir que no se observó protección. Sin embargo, otros autores (Weissenbacher y col., comunicación personal), trabajando en condiciones experimentales comparables pudieron detectar anticuerpos, aunque en títulos muy bajos, en animales sobrevivientes a la inoculación con las diluciones más altas de XJ, y en sus experimentos 1 DL_{50} fue aproximadamente igual a 5 DI_{50}. Lamentablemente, en este grupo de animales no se evaluó protección. Estos resultados confirman la atenuación de la variante XJ_0 y ponen en evidencia el amplio margen existente entre la dosis letal y la dosis protectora.

Si bien la mortalidad atribuible a XJ_0 fue dependiente de la dosis inoculada, no lo fue la recuperación de virus, que pudo ser demostrado en el 15 % de los animales muertos espontáneamente. Este comportamiento y la falta de signos hemorrágicos en dichos animales coincide con lo observado con $XJCl_3$. Además, el promedio del día de muerte para cada dosis fue significativamente más prolongado que para XJ. Todo esto sugiere que la atenuación de XJ_0 está acompañada por una menor invasividad, lo que conduciría a una distribución más restringida que podría ser consecuencia de una multiplicación más lenta, permitiendo así que se pongan en juego los mecanismos de defensa del huésped. Dado que las poblaciones de animales empleadas en estos trabajos son heterogéneas, como lo demuestra la amplia variación encontrada en los datos hematológicos [3, 15] o en los niveles de anticuerpos, el resultado final, muerte o sobrevida, puede depender de una condición individual del huésped. Esto estaría apoyado por los resultados de protección en función de la dosis. Cuando se emplearon 10^2 DL_{50} de XJ_0 o mayores, el 100 % de los animales resultaron protegidos frente a la descarga con la cepa patógena. Esto podría *a priori* ser atribuido a la respuesta humoral, ya que en todos ellos se detectaron niveles apreciables de

anticuerpos neutralizantes a los 30 días pi, es decir, antes del desafío. Sin embargo, en los grupos que recibieron menos de 10^2 DL_{50} algunos animales, con títulos de anticuerpos Nt entre 1 : 50 y 1 : 60, es decir comparables a los detectados en los grupos infectados con dosis mayores, murieron como consecuencia del desafío. Parecería, por lo tanto, que la protección conferida no depende únicamente del nivel de anticuerpos neutralizantes, sino de otros factores de resistencia. Este hecho se puso de manifiesto cuando el estímulo antigénico usado fue bajo, ya que cuando se emplearon dosis mayores quedó enmascarado.

Otro aspecto interesante observado cuando se usó el estímulo límite 10 a 1 DL_{50} es que algunos animales, aun cuando murieron como consecuencia del desafío en el mismo período que el grupo control, no presentaron los signos hemorrágicos que caracterizan a la muerte provocada por XJ. Este hecho fue dependiente de la dosis XJ_0 recibida, y no de la presencia de bajos títulos de anticuerpos neutralizantes. Esta ausencia de lesiones hemorrágicas también ha sido descripta en cobayos infectados con bajas dosis de $XJCl_3$, que sucumbieron al desafío con XJ y en otros infectados con XJ y tratados con inmunosuero específico, pero que no pudieron sobrevivir a la enfermedad [20]. Esto parecería indicar que en muchos casos, si bien no existe una protección suficiente para evitar la muerte del animal, la acción patógena de la cepa XJ resulta modificada, alterándose el cuadro anatomopatológico producido.

El estudio de la evolución de la protección conferida por la variante XJ_0 demostró que ésta se estableció en algunos animales en forma precoz desde los 3 días pi. A partir de este momento, el número de animales protegidos aumentó en forma continua hasta alcanzar el 100 % a los 60 días pi. Si bien la presencia de anticuerpos circulantes desde los 15 días pi proporciona una base para explicar la protección detectada a partir de esa fecha, no permite justificar la resistencia observada en el período anterior. En cobayos inoculados con virus Tacaribe y desafiados secuencialmente con XJ [9] también se encontró una protección temprana, aunque en este caso ésta desapareció hacia los 12 días pi para restablecerse 2 días más tarde. Los autores atribuyeron esa protección temprana a un fenómeno de interferencia que decae a los 12 días pi cuando aún la respuesta humoral heteróloga no es suficiente, y sugieren que a los 14 días si bien los anticuerpos heterólogos aún no son detectables, el restablecimiento de la protección puede atribuirse a una rápida respuesta secundaria presentada por los animales al ser infectados con XJ [8, 18]. En nuestro caso, creemos que la explicación de la protección temprana también puede estar mediada por un mecanismo de interferencia que por causas dependientes posiblemente del huésped, sólo se establecería en algunos animales. La diferencia fundamental entre ambos modelos estriba que en los animales inoculados con XJ_0 aparece una curva de protección continua. Esto podría deberse al establecimiento de una respuesta inmune más efectiva, fácilmente explicable dada la estrecha relación antigénica entre XJ y XJ_0, lo que conduciría a que el decaimiento del mecanismo de interferencia coincida con el establecimiento de una resistencia específica mediada por la respuesta inmunológica.

Resumen

La titulación de stocks de la cepa prototipo XJ y de su variante atenuada XJ_0 en cobayos inoculados por vía intramuscular y desafiados a los 37 días pi con la cepa patógena, permitió establecer una relación entre la DL_{50}, DI_{50} y DP_{50}. Los resultados mostraron que para el modelo cobayo, en el esquema experimental usado, 1 DL_{50} de XJ_0 equivale a $10^{4.7}$ DI_{50} y a $10^{3.7}$ DP_{50} mientras que la DL_{50} de XJ es aproximadamente igual a la DI_{50}, no detectándose protección. La capacidad antigénica, letal y protectora de la variante XJ_0 se estudió en cobayos inoculados con dosis decrecientes, 10^6 a 10^{-1} DL_{50}, encontrándose que la mortalidad fue proporcional a la dosis infectante, aunque a diferencia de lo observado con la cepa prototipo nunca sobrepasó el 70 %, descendiendo al 10 % con 10^3 DL_{50}. No se observaron muertes con dosis menores. El desafío efectuado a los 37 días pi con 10^2 DL_{50} de XJ por

vía im demostró que todos los animales pertenecientes a los grupos infectados con 10^6 a 10^2 DL_{50} de XJ_0 estaban protegidos, en tanto que en los infectados con dosis menores la protección fue disminuyendo con la dosis. En todos los animales protegidos se detectaron anticuerpos neutralizantes en el momento del desafío, en niveles variables. En algunos de los que murieron también se encontraron niveles bajos de anticuerpos neutralizantes. La cinética de la protección se evaluó en cobayos inoculados con 10^3 DL_{50} de XJ_0 por vía im y desafiados desde los 3 a 90 días pi con 10^2 DL_{50} de XJ por la misma vía. Se comprobó que ya a los 3 días pi el 37.5 % de los animales habían desarrollado una protección que fue incrementándose en forma consistente hasta alcanzar al 88.8 % a los 30 días pi y al 100 % desde los 60 días pi. Los anticuerpos neutralizantes detectados en títulos bajos desde 15 días pi, fueron aumentando lentamente hasta llegar a valores de 1 : 850 después de los 30 días pi. Se considera que la protección temprana se debe a fenómenos de interferencia entre la cepa XJ y su variante XJ_0, que al desvanecerse sería sustituida por una inmunidad específica inducida por la XJ_0, dando como resultado una curva de protección que aumentó en forma continua.

Summary

PROTECTION INDUCED BY THE ATTENUATED XJ_0 VARIANT OF JUNIN VIRUS IN GUINEA PIGS.

As previously shown, the XJ_0 variant of Junin virus XJ strain is attenuated and capable of inducing a solid protection in guinea pigs. In this paper, using the same guinea pig model, the humoral response and kinetics of the protection induced by the XJ_0 variant was studied and new evidence of its attenuation is presented. The guinea pigs were distributed in 3 groups. Six subgroups of 6 to 10 animals (group I) were inoculated with 10^3 to 10^{-2} LD_{50} of XJ, respectively; 8 subgroups of 10 animals (group II) received 10^6 to 10^{-1} LD_{50} of XJ_0, respectively; and 93 guinea pigs (group III) were infected with 10^3 LD_{50} of XJ_0. Surviving animals from groups I and II and 5 uninfected controls were challenged after 37 days with 10^2 LD_{50} of XJ. Guinea pigs from group III were challenged in the same way as above but after 0, 3, 6, 9, 12, 15, 21, 30, 60 and 90 days pi. At each time, 8 infected and 4 normal (controls) guinea pigs were used. All the inoculations were performed by im route. Complement fixing and neutralizing antibodies were assayed in sera samples obtained before and 45 days after the challenge. Attempts of virus isolation were performed in organs of animals which died spontaneously before the challenge with XJ. From the data obtained from groups I and II (Table 1) it was possible to calculate comparatively the relationship between the lethal, infective and protective doses. In this model 1 LD_{50} of XJ_0 was equivalent to $10^{4.7}$ ID_{50} and to $10^{3.7}$ PD_{50}, while for XJ 1 LD_{50} was practically equivalent to 1 ID_{50}. In this last case no protection was found. In group II the percent of mortality attributable to XJ_0 (death occurring before the challenge) was proportional to the infective dose of virus, being the extreme values, 70 % with 10^6 LD_{50} and 0 % with 10^2 LD_{50} or less. Only 2 out of 13 attempts of virus isolations were successful, irrespectively of the infective XJ_0 dose. All the survivors from subgroups inoculated with 10^6 to 10^2 LD_{50} resisted the challenge but with doses less than 10^2, the protection decreased from 45 % for 10 LD_{50} to 0 % for 10^{-1} LD_{50}. Prechallenge Nt antibodies (Fig. 2) were detected in all the animals where protection was shown, although in some of them the level was low. Nevertheless some guinea pigs belonging to subgroups that received 10^1 or less LD_{50} of XJ_0 showing low levels of Nt antibodies died after the challenge, suggesting that humoral immunity is not the only mechanism involved in the protection. No survivors were observed without prechallenge antibodies. The kinetics of protection together with Nt antibody levels appear in Figure 4, with 37 % protection on the 3rd day pi. This protection increased progressively with the pi period up to 88.8 % by the 30th day pi, reaching 100 % at 60 and 90 days pi. Nt antibodies were detected from 12 and 15 days pi, and could be responsible for the observed protection from that time onwards. Early resistance may be adscri-

bed to an interference phenomenon, overlapping later with the immune mechanism to give a continuous protection curve. These results indicate that for XJ_0 there is a wide range between the lethal and protective doses, that a high level of protection can be induced with a relatively low dose of XJ_0 and that this protection increases continuously from the 3rd day pi onwards.

Agradecimientos: Este trabajo se realizó con el apoyo financiero de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Nación, y de la Secretaría de Estado y Salud Pública de la Nación. Se agradece la excelente colaboración técnica de las Sras. P. B. de Palade y Estela Villafañe, en la preparación de los cultivos celulares.

Bibliografía

1. Avila MM, Samoilovich S, Weissenbacher M C: Infección del cobayo con la cepa atenuada del virus Junin $XJCl_3$. *Medicina (Bs Aires)* 39: 597, 1979.
2. Boxaca MC: Establecimiento y características de una sublínea de células Vero persistentemente infectada con virus Junin. *Medicina (Bs Aires)* 30 (Supl 1): 50, 1970.
3. Boxaca MC, Giovanniello OA, Nota NR, Nejamkis MR, Guerrero LB de, Frigerio MJ: Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junin. Cuadro clínico y susceptibilidad. *Rev Asoc Arg Microbiol* 5: 2, 1973.
4. Boxaca MC, Guerrero LB de, Frigerio MJ, Rondinone SN, Rabinovich RD: Algunos aspectos de la infección experimental del cobayo con una variante atenuada del virus Junin. *Medicina (Bs Aires)* 40: 521, 1980.
5. Boxaca MC, Savy VL: Estudio comparativo de la acción del virus Junin en distintos cultivos celulares. *Medicina (Bs Aires)* 32: 260, 1972.
6. Clarke DH, Casals J: Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne virus. *Am J Trop Med Hyg* 7: 561, 1958.
7. Contigiani MS, Sabattini MS: Virulencia diferencial de cepas de virus Junin por marcadores biológicos en ratones y cobayos. *Medicina (Bs Aires)* 37 (Supl 3): 244, 1977.
8. Coto CE, Damonte EB, Calello MA, Weissenbacher MC: Protection of guinea pigs inoculated with Tacaribe virus against lethal doses of Junin virus. *J Infec Dis* 141: 389, 1980.
9. Damonte EB, Coto CE, Calello MA, Weissenbacher MC: Inmunización heteróloga contra virus Junin. Protección temprana. *Medicina (Bs Aires)* 38: 226, 1978.
10. Guerrero LB de, Boxaca MC, Weissenbacher MC, Frigerio MJ: Infección experimental del cobayo con virus Junin. Cuadro Clínico, diseminación y eliminación de virus. *Medicina (Bs Aires)* 37: 271, 1977.
11. Guerrero LB de, Boxaca MC: Estudio preliminar de una variante atenuada del virus Junin derivada de la cepa prototipo XJ. *Medicina (Bs Aires)* 40: 267, 1980.
12. Guerrero LB de, Weissenbacher MC, Parodi AS: Inmunización contra la Fiebre Hemorrágica Argentina con una cepa atenuada del virus Junin. I. Estudio de una cepa modificada del virus Junin. Inmunización de cobayos. *Medicina (Bs Aires)* 29: 1, 1969.
13. Lennette EV: General principles underlying laboratory diagnosis for viral and rickettsial infections. *In:* Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections. Ed Lennette EH, Schmidt NJ, New York, 1969, p 52.
14. Nota NR, Frigerio MJ, Guerrero LB de, Nejamkis MR: Estudio hematológico en cobayos infectados con virus Junin cepas XJ y cepa $XJCl_3$. *Medicina (Bs Aires)* 33: 171, 1965.
15. Parodi AS, Coto CE, Boxaca MC, Lajmanovich S, González S: Characteristics of Junin virus Etiological agent of Argentine Hemorrhagic Fever. *Arch fur ges Virusforsch* 4: 393, 1966.
16. Parodi AS, Guerrero LB de, Astarloa L, Cintora A, González Cambaceres C, Maglio F, Magnoni C, Milani H, Ruggiero H, Squassi G: Inmunización contra la Fiebre Hemorrágica Argentina con una cepa atenuada del virus Junin. IV. Valoración de respuestas clínica e inmunológica. *Medicina (Bs Aires)* 30 (Supl 1): 3, 1970.
17. Ruggiero HA, Cintora AF, González Cambaceres C, Milani HA, Magnoni C, Astarloa L, Maglio F, Pérez Izquierdo F: Inmunización contra la Fiebre Hemorrágica Argentina con una cepa atenuada del virus Junin. Análisis de 636 vacunados. *Pren Med Arg* 61: 231, 1974.
18. Weissenbacher MC, Coto CE, Calello MA, Frigerio MJ, Damonte E: Protección experimental contra el virus Junin por inoculación de virus Tacaribe. *Medicina (Bs Aires)* 37 (Supl 3): 237, 1977.
19. Weissenbacher MC, Guerrero LB de, Help G, Parodi AS: Inmunización contra la Fiebre Hemorrágica Argentina con una cepa atenuada del virus Junin. III. Reacciones serológicas en voluntarios. *Medicina (Bs Aires)* 29: 88, 1969.
20. Weissenbacher MC, Guerrero LB de, Parodi AS: Acción de los inmunosueros en la Fiebre Hemorrágica Experimental. *Medicina (Bs Aires)* 28: 53, 1968.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 35-39 (1981)

CHRONIC CHAGAS DISEASE IN THE MOUSE

I. ELECTROCARDIOGRAPHIC AND MORPHOLOGICAL PATTERNS OF THE CARDIOPATHY

R. P. LAGUENS, PATRICIA CABEZA MECKERT *, R. J. GELPI **

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

We have recently described the main features of an animal model of chronic Chagas disease, similar to the human illness, from the pathological, immunological and electrocardiographic points of view [6]. In the present report, a more detailed description of the morphological and electrocardiographic alterations of the heart is presented, in order to establish the patterns characteristic of experimental chronic chagasic cardiopathy in the mouse.

Material and methods

Outbred Swiss mice of both sexes and 3 months old were used. Parasites and infection schedule were similar to that described in a previous paper [6]. Electrocardiograms were obtained under slight ether anesthesia at 30, 90, 180 and 360 days post-infection (pi); D_I, D_{II}, D_{III}, AVL and AVF leads were recorded in each animal. Groups of 20 animals were killed after obtaining the electrocardiograms. The heart was removed and processed for light microscopy using semiserial transversal sections stained with hematoxylin eosin. A series of 40 non-infected mice of corresponding ages were studied under the same condition.

Results

Macroscopic findings: In all the course of the experiment no increase in heart size was noticed.

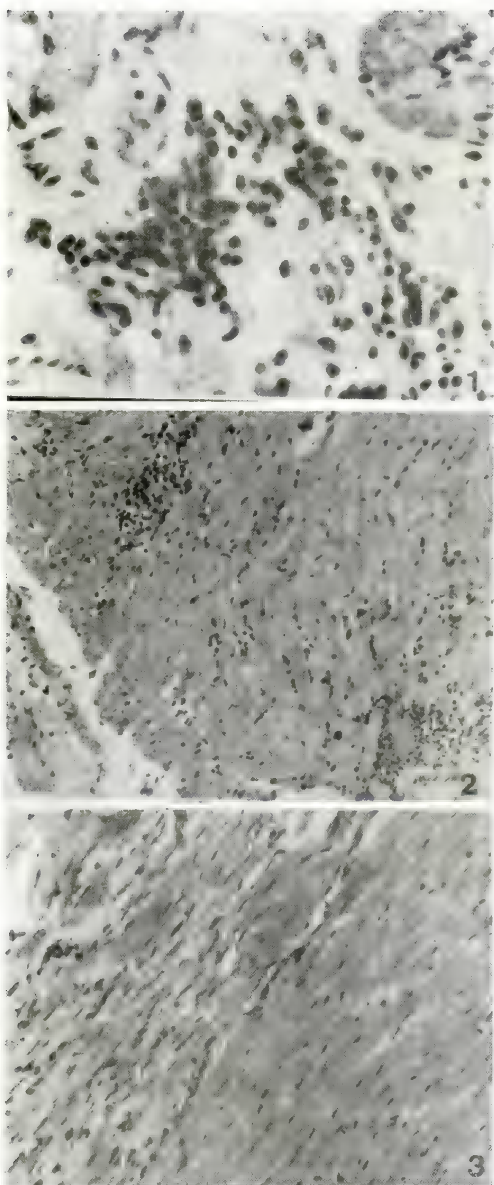
Light microscopy: At one month pi a heavy mononuclear infiltrate was seen in both atria with minor lesions in the ventricles (Fig. 1) At 3 months pi the ventricles showed numerous foci of focal myocarditis scattered in a random fashion, with no preferential localization (Fig. 2). At this moment the atria involvement was less intense. The cells in the inflammatory infiltrate resembled small lymphocytes with a few elements of the reticulo-monocytic series. At 6 and 12 months pi the mononuclear infiltrates were almost absent but numerous fibrotic scars were seen randomly dispersed (Fig. 3). These lesions were present in all the animals examined, but with variable intensity. In approximately 50 % of the animals, large areas of inflammation or scarring were seen. In the other half only scarce lesions could be detected. In none of the animals could parasite nests be seen in spite of the large number of sections examined.

Received: 5-XI-1980. Accepted: 19-XI-1980.

* Member of Technical Career of CIC (Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires).

** Fellow of CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Postal address: Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, calle 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina.



Figs. 1-3. — **1.** Mononuclear interstitial infiltrate in the atrium at 30 days pi H & E x 400; **2.** Focal mononuclear infiltrates in the ventricular septum at 90 days pi H & E x 150; **3.** Fibrotic scar in the ventricular wall at 180 days pi H & E x 250.

Electrocardiographic studies: In approximately 50 % of the infected animals definite abnormalities were found. They consisted of atrial and ventricular extrasystolia, atrio-ventricular blocking of 1st and 2nd degree (Figs. 5 and 6) and increase in the duration of the QRS complex above 0.04 sec (Fig. 7). The remaining half of the animals did not show alterations. The type of ECG abnormalities showed a different prevalence according to the time of the infection. In the mice studied at 30 days pi atrial extrasystolia was prevalent but in the animals studied after 90 days pi ventricular extrasystolia and increase in the duration of the QRS complex were the most frequent findings. Results are summarized in Tables 1 and 2. In no case were variations in heart rate noticed. In none of the control mice were electrocardiographic abnormalities found and the QRS duration was never above 0.025 sec (Fig. 4).

Discussion

The mouse has been one of the most widely used species for the study of *T. cruzi* infection. Generally, highly pathogenic strains of the parasite produce an acute illness with death of the animals in variable periods of time [1]. Inoculation with strains of low pathogenecity produces a chronic infection with sustained levels of parasitemia and minimal heart pathology [2, 3]. These models are not similar to the human chronic illness, which characteristically shows minimal parasitemia and severe heart lesions [7]. To our knowledge, few reports exist describing chronic chagasic cardiopathy in laboratory animals. Teixeira et al [9] have obtained heart failure and fibrotic scars in rabbits infected with Ernestina strain of *T. cruzi.* Johnson at al [4] described a chronic cardiopathy in infected puppies. These models present the disadvantage of the long time necessary for the induction of the disease and the high cost, which difficults experiments with a large number of animals. In addition, in most cases heart disease was assessed by necropsic studies and no description exists on the evolution of the illness in living animals.

In the present paper it has been shown that infection of adult mice with a low number of trypomastigotes of a pathogenic strain of *T. cruzi* produces a heart disease similar in the main features to that

Figs. **4-7.** — **4.** ECG from a normal mouse; **5.** AV block of 1st. degree; **6.** AV block of 2nd. degree. Mobitz type I. (Wenckebach phenomenon); **7.** Widening of the QRS complex (above 0.04 sec).

observed in Chagasic humans, either from the morphological or the electrocardiographic points of view. As occurs in humans, chagasic mice present a mononuclear myocarditis which evolves to scarring and replacement of muscle fibres [5]. These lesions were never associated with the presence of parasites, a fact wich represents one of the landmarks of the human illness [10]. In a similar way, parasitemia in mice was also minimal and could only be demonstrated by means of xenodiagnosis. With the exception of bradycardia, usually not present in humans, the remaining electrocardiographic alterations were identical with those present in human chagasic cardiopathy [8]. The lack of alterations on the

TABLE 1. — *Incidence of ECG abnormalities at different times post-infection*

Days post-infection	30	90	180	360
Animals	63	10	140	14
Normal	32	5	63	5
Pathologic	31	5	77	9

TABLE 2. — *Variation of ECG alterations at different times post-infection*

Days post-infection	30	90	180	36C
Auricular extrasystolia	9(29 %)*	0 *	5(6 %)*	0
Ventricular extrasystolia	4(12 %)*	3(60 %)*	28(36 %)*	2(22 %)
QRS > 0.04 sec.	0 *	3(60 %)*	18(23 %)*	6(67 %)*
AV blocking 1st. degree	14(45 %)*	1(20 %)	22(28 %)*	0
AV blocking 2nd. degree	4(13 %)*	0	17(22 %)	1(11 %)

* $p < 0.01$ (χ^2) comparing 30 days pi group with the remaining groups. Ventricular extrasystolia and QRS > C.C4 sec were found simultaneously in 13 mice of the 90 and 180 days pi groups.

right brach of the bundle of His can be attributed to differences in the anatomy of the conduction system of the mouse as compared to man. The preeminence of inflammatory lesions in the atria at 30 days pi and posterior extension to the ventricles is in agreement with the electrocardiographic findings which show a higher incidence of auricular extrasystolia at 30 days pi and ventricular extrasystolia and disturbances of intraventricular conduction at later times pi. These facts also suggest a progression of lesions in function of time.

From these results it can be concluded that in the experimental model described herein it is possible to induce in the mouse a chronic heart disease resembling human chagasic cardiopathy, either from the morphological or the electrocardiographic points of view.

Summary

Chronic chagasic cardiopathy was induced in Swiss albino mice by inoculation of 25 trypomastigotes of the Tulahuen strain. Electrocardiograms and morphological studies of the heart were performed at 30, 90, 180 and 360 days post-infection (pi). In the animals studied 30 days pi atrial myocarditis was present. At 90 days pi the inflammatory lesions were predominant in the ventricles, and at 180 and 360 days pi fibrotic scars were seen. Definite electrocardiographic abnormalities were found in 50 % of the animals, consisting of auricular and ventricular extrasystolia, first and second degree blocking and increase in the duration of the QRS complex. At 30 days pi auricular extrasystolia were the most frequent finding while at later times pi ventricular extrasystolia and increase in the duration of the QRS complex were prevalent. From these results it can be concluded that in experimental chronic chagasic cardiopathy of the mouse definite morphological and electrocardiographic alterations, similar to those observed in the human disease, are present.

Resumen

Enfermedad de Chagas crónica en el ratón. I. Estudios electrocardiográficos y morfológicos del corazón.

Se indujo cardiopatía chagásica crónica en ratones Swiss albinos exocriados, por medio de la inoculación de 25 tripomastigotes de la cepa Tulahuen. A los 30, 90, 180 y 360 días post-infección (pi) se realizaron estudios electrocardiográficos y morfológicos del corazón. En los animales examinados 30 días pi, se observó una miocarditis con localización preferentemente auricular, en tanto que a los 90 días pi las lesiones inflamatorias estaban ubicadas preferentemente en los ventrículos. A los 180 y 360 días pi se observaron cicatrices fibrosas. En todos los casos las lesiones eran nodulares y no mostraron una ubicación preferencial. A pesar de los numerosos cortes estudiados no fue posible encontrar nidos de parásitos. En el 50 % de los animales se encontraron alteraciones electrocardiográficas consistentes en extrasistolia auricular y ventricular, bloqueo de 1º y 2º grado y aumento de la duración del complejo QRS superior a 0.04 seg. En los animales estudiados a los 30 días pi la alteración más frecuente consistió en extrasistolia auricular, en tanto que los animales estudiados en tiempos posteriores presentaron una mayor incidencia de extrasistolia ventricular y aumento de la duración del complejo QRS. Estos resultados indican que la infección del ratón con un pequeño número de tripomastigotes de una cepa patógena conduce al desarrollo de una cardiopatía crónica con notables similitudes con la enfermedad humana, tanto del punto de vista morfológico como electrocardiográfico. Además, la diferente distribución de la miocarditis y la variación de trastornos electrocardiográficos sugieren una progresión de las lesiones en función del tiempo.

Acknowledgment: This work was supported by grants from SECYT (Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología).

References

1. Andrade SG, Andrade ZA: Aspectos patogenéticos da miosite chagasica experimental. *Gaz Med Bahía* 67: 126, 1967.
2. Bice DE, Zaledon R: Comparison of infectivity of strains of *Trypansoma cruzi* (Chagas 1909). *J Parasitol* 56: 663, 1970.
3. Brener Z: Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 59: 19, 1965.
4. Johnson C: Cardiac changes in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med* 18: 167, 1930.
5. Laranja FS, Dias E, Nobrega G, Miranda A: Chagas'disease: A clinical, epidemiological and pathologic study. *Circulation* 14: 1035, 1956.
6. Laguens R, Cabeza Meckert P, Basombrío MA, Chambó G, Cossio P, Arana R, Gelpi RJ: Infección crónica del ratón con *Trypanosoma cruzi*. Modelo experimental de Enfermedad de Chagas. *Medicina (Bs As)* Supl 1, 40: 33, 1980.
7. Margarino Torres C: Patogenia de la miocarditis crónica de la Enfermedad de Chagas. *Quinta Reunión de la Soc Argentina de Patología Regional del Norte* 2: 902, 1929.
8. Rosenbaum MB, Alvarez AJ: The electrocardiogram in chronic chagasic myocarditis. *Am Heart J* 50: 492, 1955.
9. Teixeira A, Teixeira M, Santos Buch C: The immunology of experimental Chagas disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas'disease in man. *Am J Path* 80: 163, 1975.
10. Vianna G: Contribuição para o estudo da anatomia patologica da molestia de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 3: 276, 1911.

— — — —

It seems to me that the safest and most prudent of bets to lay money on is surprise. There is a very high probability that whatever astonishes us in biology today will turn out to be usable, and useful, tomorrow. This, I think, is the established record of science itself, over the past two hundred years, and we ought to have more confidence in the process. It worked this way for the beginnings of chemistry; we obtained electricity in this manner; using surprise as a guide we progressed from Newtonnian physics to electromagnetism, to quantum mechanics and contemporary geophysics and cosmology. In biology, evolution and genetics were the earliest big astonishments, but what has been going on in the past quarter century is simply flabbergasting. For medicine, the greatest surprises lie still ahread of us, but they are there, waiting to be discovered or stumbled over, sooner or later.

Me parece que la inversión de dinero más segura y prudente es apostar a la sorpresa. Existe una muy alta probabilidad de que cualquier cosa que nos asombre hoy en biología resulte aplicable, y útil, mañana. Esto, creo, queda establecido por los logros mismos de la ciencia en los pasados doscientos años y deberíamos tener más confianza en el proceso. Resultó así en los comienzos de la química; de esta manera obtuvimos la electricidad; usando la sorpresa como guía progresamos de la física newtoniana al electromagnetismo, a la mecánica cuántica y la geofísica y cosmología contemporánea. En biología la evolución y la genética fueron los grandes asombros iniciales pero lo que ha ocurrido en el pasado cuarto de siglo es simplemente pasmoso. Para la medicina las sorpresas mayores están aún delante nuestro, pero allí están, esperando ser descubiertas o halladas por tropiezo, tarde o temprano.

LEWIS THOMAS
The medusa and the snail, 1979

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 40-43 (1981)

CHRONIC CHAGAS DISEASE IN THE MOUSE

II. TRANSFER OF THE HEART DISEASE BY MEANS OF IMMUNOCOMPETENT CELLS

R. P. LAGUENS, PATRICIA CABEZA MECKERT *, G. CHAMBO *, R. J. GELPI **

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

The pathogenesis of tissue damage in chronic chagasic cardiopathy is not completely understood at the present time. Although there is ample evidence supporting the participation of immune mechanisms in the production of alterations (for review see [2]) the existence of autoimmune phenomena has not been definitely demonstrated. The recent development of an experimental model of chagasic heart disease in the mouse [7] allowed us to start experiments with inbred strains of mice. In the present report, the results of the transfer of non-adherent mononuclear spleen cells from chronically chagasic mice, on the heart of normal recipients is described, in an attempt to demonstrate the existence of autoimmune phenomena in the development of heart alterations in chronic Chagas disease.

Material and methods

Experimental design: A total of 21 recipient females, 3 months old BALB/c mice, were injected intraperitoneally (ip) with 10^6 non-adherent splenic mononuclear cells obtained from chronically infected chagasic BALB/c mice killed at 4 months post-infection (pi). Electrocardiograms (ECG) were obtained one day before and 1, 2, 3, 5, 14, 30 and 120 days after cell transfer. In each case, 2 recipient mice were killed for morphological studies. As control, the same experiment was performed on BALB/c mice injected with 10^6 splenic non-adherent mononuclear cells obtained from normal non-infected BALB/c mice.

Induction of chronic Chagas disease: Inbred 3 months old female BALB/c mice were injected with 25 trypomastigotes of the Tulahuen strain. The details of the infection are described elsewhere [7]. Successful infection was confirmed by the finding of parasites in peripheral blood at least once in samples obtained weekly during the first month pi. All animals presented myocarditis and myositis.

Fractionation of spleen cells: The spleen was trimmed with scissors and passed through a 200 mesh stainless steel screen. The cells were suspended in Eagle's minimal essential medium (MEM) in a Ficoll-Hypaque gradient. The layer of mononuclear cells was washed twice in MEM and incubated 1 hour at 37° C in 100 ml tissue culture flasks in order to remove the adherent cells. Cell viability was assessed by trypan-blue exclusion test and suspension was adjusted to 10^6 viable cells per ml. The examination of Giemsa stained smears showed that over 95 % of the cell suspension were small lymphocytes.

Electrocardiographic studies: D_I, D_{II}, D_{III} and AVF leads were registered under a slight ether anesthesia using a conventional electrocardiograph operated at a speed of 5 m/second.

Morphological studies: The animals were killed with ether, the whole heart was fixed in Bouin and embedded in Paraplast. Serial 5 μm sections

Received: 5-XI-1980. Accepted: 19-XI-1980.

* Member of Technical Career of CIC (Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires).

** Fellow of CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Postal address: Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, calle 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina.

obtained every 500 μm were stained with hematoxylin-eosin.

Infectivity assay: In order to control the presence of parasites in the cell suspensions, groups of 4 newborn Swiss mice were injected with 0.1 ml of the cell suspensions from each donor mouse. Mortality and parasitemia were controlled until 60 days post-injection.

Results

Infectivity assay: None of the injected animals died and no parasites were observed in the direct examination of peripheral blood.

ECG studies: The ECGs obtained prior to cell transfer did not show alterations. In 10 out of 21 recipient mice definite alterations were noticed consisting of first degree of auriculo-ventricular block, ventricular extrasystolia and bradycardia. These alterations appeared from days 1 to 4 after cell transfer and were generally temporary, lasting between 2 and 14 days. Only in four mice were alterations persistent at 30 and 120 days post-transfer. None of the mice injected with cells from non-infected donors showed ECG alterations.

Morphological studies: All mice killed from day 1 to 14 after transfer presented lymphocytic infiltrates in the myocardium. They were more marked in the atria and generally were nodular (Fig. 1), although at times a mild diffuse infiltrate could be seen. In the animals injected with cells from non-chagasic mice the myocardium appeared normal and no cell infiltration was observed.

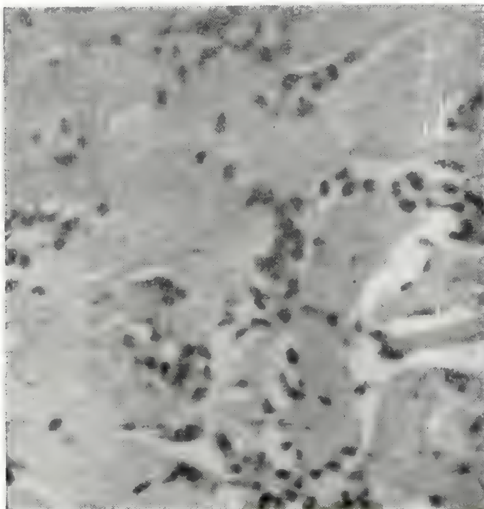


Fig. 1. — Atrium 2 days after cell transfer from a chagasic mouse. A heavy lymphocytic interstitial infiltrate can be seen. H & E x 350.

Discussion

A few years after the description of Chagas disease, indirect mechanisms supposedly "allergic" according to the terminology of the time, were postulated, on the basis of the lack of parasites in the affected areas, the long time elapsing between infection and development of cardiopathy and the type of cells involved in the inflammatory reaction. Since that time, much evidence has accumulated supporting the participation of immune mechanisms in the production of tissue damage. This evidence, summarized in a recent review [2], includes: presence of heart antibodies in the sera of chagasic humans [3] and of animals infected with *T. cruzi* [7, 12]; presence of antibodies reacting with heart muscle sarcolemma and endothelium plasma membrane [4] and with skeletal muscle [6] in the sera of chagasic patients. In addition, evidence supporting the participation of cell-mediated mechanisms has been obtained, such as the presence of mononuclear cells in close relationship with heart muscle cells in chagasic humans [4], myocardial cytoadherence of lymphocytes obtained from humans [1] and from animals infected with *T. cruzi* [10], induction of chronic myocarditis in rabbits immunized with subcellular fractions of *T. cruzi* [12] and autoaggresive T lymphocytes during chronic *T. cruzi* infection in mice [9]. Although all these observations lend strong support to the possibility of immune mechanisms in the pathogenesis of chagasic myocarditis, no definite proof has been provided in favor of the existence of autoimmune phenomena. However, we feel that the evidence presented herein lends strong support to the belief that autoimmunity operates in the pathogenesis of chagasic heart disease. In our experiments, it has been possible to: 1) induce an experimental disease with marked similarities with the human illness; 2) transfer the disease into normal recipients by means of cells engaged in the immune

response; 3) produce histological and electrocardiographic alterations in the recipients similar to those present in the donor animals. Studies are now in progress to determine the type of cell involved in transference and to establish which are the antigens responsible for the disease. The possibility of contamination of cells with *T. cruzi* was ruled out, since no infection of newborn mice could be observed even though it has been repeatedly demonstrated that the Tulahuen strain used for the present work is highly pathogenic for mice[8]. Furthermore, the precocity of the ECG and morphological alterations in absence of parasites in peripheral blood of the recipient mice would also discard an accidental transfer of viable parasites.

Summary

Splenic non-adherent mononuclear cells from BALB/c mice chronically infected with T. cruzi *were transferred into normal recipients of the same strain. Electrocardiograms and microscopic studies of the heart were performed at 1 2, 3, 5, 14, 30 and 120 days after transference. Ten out of 21 animals showed definite electrocardiographic abnormalities (auricular-ventricular block and ventricular extrasystolia) which were transient and lasted between 2 and 14 days. The morphological studies showed lymphocytic infiltrates predominant in the atria. Contamination of the cell suspensions with living parasites was ruled out by inoculation of aliquots into suckling Swiss mice. In controls injected with spleen cells from non-infected mice no ECG abnormalities or myocarditis were found. These results indicate that chronic cardiopathy can be transferred to normal mice by means of cells engaged in the immune response, and lend support to the presence of autoimmune phenomena in the pathogenesis of tissue damage in chagasic cardiopathy.*

Resumen

Enfermedad de Chagas crónica en el ratón. II. Transferencia de enfermedad cardíaca por medio de células inmunológicamente competentes.

Con el fin de indagar la posible existencia de mecanismos autoinmunes en la producción de cardiopatía chagásica, se transfirieron células inmunológicamente competentes provenientes de ratones con cardiopatía chagásica crónica experimental, a receptores normales de la misma cepa. Se obtuvieron células no-adherentes esplénicas de ratones BALB/c infectados 4 meses antes con 25 trypomastigotes de la cepa Tulahuen de T. cruzi, *con cardiopatía confirmada histológicamente. Un total de 10^6 células mononucleares esplénicas fueron inyectadas en ratones BALB/c. Se realizaron estudios electrocardiográficos y anatomopatológicos del corazón a los 1, 2, 3, 5, 14, 30 y 120 días después de la transferencia. Como control se realizó el mismo experimento transfiriendo células de ratones no infectados. El estudio electrocardiográfico mostró alteraciones (bloqueo aurículo-ventricular y extrasistolia ventricular) en 10 de 21 ratones inyectados con células de animales con cardiopatía. El estudio histológico mostró infiltrados linfocitarios, con predominio auricular, en todos los animales. En ninguno de los 21 controles se observaron trastornos electrocardiográficos o lesiones histológicas del corazón. La posibilidad de transferencia de parásitos viables fue investigada, con resultado negativo, inoculando alícuotas de las suspensiones celulares en ratones Swiss lactantes. Estos resultados indican que la cardiopatía chagásica crónica del ratón puede ser transferida a receptores normales por medio de células comprometidas en la respuesta inmune y apoya la participación de fenómenos de autoinmunidad en la producción del daño celular.*

Acknowledgment: This work was supported by grants from SECYT (Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología).

References

1. Cossio PM, Damilano G, de la Vega MT, Laguens RP, Cabeza Meckert PM, Diez C, Arana RM: In vitro interaction between lymphocytes of Chagasic individuals and heart tissue. *Medicina (Bs Aires)* 36: 287, 1976.

2. Cossio PM, Diez C, Laguens RP, Arana RM: Inmunopatología de la enfermedad de Chagas. Hechos y perspectivas. *Medicina (Bs Aires)* 40: Supl 1, 222, 1980.

3. Cossio PM, Laguens RP, Diez C, Szarfman A, Segal A, Arana RM: Chagasic Cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation* 50: 1252, 1974.

4. Cossio PM, Laguens RP, Kreutzer E, Diez C, Segal A, Arana RM: Chagasic Cardiopathy; Immunopathologic and morphologic studies in myocardial biopsies. *Am J Pathol* 86: 533, 1977.

5. de la Vega MT, Cossio PM, Szarfman A, Diez C, Damilano G, Segal A, Laguens RP, Arana RM: Inhibición de la migración leucocitaria con antígenos cardíacos en la infección chagásica. *Medicina (Bs Aires)* 35: 611, 1975.

6. Laguens RP, Cossio PM, Diez C, Segal A, Vásquez C, Kreutzer E, Khoury EL, Arana RM: Immunopathologic and morphologic studies of skeletal muscle in Chagas' disease. *Am J Pathol* 80: 153, 1975.

7. Laguens RP, Cabeza Meckert P, Basombrío MA, Chambó GJ, Cossio PM, Arana RM, Gelpi R: Infección crónica del ratón con *T. cruzi.* Modelo experimental de enfermedad de Chagas. *Medicina (Bs Aires)* 40: Supl 1, 33, 1980.

8. Pizzi T, Prager RS: Inmunidad sobre infección inducida mediante cultivos de *Trypanosoma cruzi* de virulencia atenuada. *Biol Inform Parasitol Chilena* 7: 20, 1952.

9. Ribeiro Dos Santos R, Hudson L: *Trypanosoma cruzi:* immunological consequences of parasite modification of host cells. *Clin exp Immunol* 40: 36, 1980.

10. Santos Buch CA, Teixeira ARL: The immunology of experimental Chagas' disease. III. Rejection of allogeneic heart cells in vitro. *J Exp Med* 140: 38, 1974.

11. Teixeira ARL, Teixeira G, Macedo V, Prata A: *Trypanosoma cruzi* sensitized T-lymphocyte mediated Cr release from human heart cells in Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 27: 1097, 1978.

12. Teixeira ARL, Teixeira ML, Santos Buch CA: The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am J Pathol* 80: 163, 1975.

— — — —

In the biological sciences research is the "quiet art", a cottage industry done in the stoa, *where one can work with the students in serenity ten or more hours a day with an abiding faith that the world's most vexatious medical problems here can be solved and very soon.*

En las ciencias biológicas la investigación es el "arte silencioso", una industria doméstica que se realiza en la *stoa*, donde se puede trabajar serenamente junto con los estudiantes diez o más horas diarias con el convencimiento de que allí podrán ser resueltos los más urgentes de los problemas médicos.

Charles B. Huggins

Experimental Leukemia and Mammary Cancer,
The University of Chicago Press, 1979

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 44-52 (1981)

MARCADORES INMUNOLOGICOS DE ATENUACION EN COBAYOS INFECTADOS CON CEPAS O VARIANTES DEL VIRUS JUNIN

JORGELINA L. BLEJER °°, NORA V. GALASSI °°°, MARTA R. NEJAMKIS °, HEBE BARRIOS °°, NORA R. NOTA °

Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Una serie de trabajos experimentales realizados en los últimos años han demostrado que la infección con ciertos virus deprime la capacidad del huésped en responder inmunológicamente a antígenos no relacionados. La mayoría de estas observaciones se refieren a virus productores de tumores, planteando la posibilidad de que esta inmunosupresión sea un factor ligado a la oncogénesis [3, 23, 26]. Sin embargo, este efecto inhibitorio sobre los mecanismos inmunológicos ha sido observado también en infecciones con virus no oncogénicos como es el caso del virus de la coriomeningitis linfocitaria, citomegalovirus, virus de sarampión, influenza, paperas, etc., [6, 8, 15, 20]. La cepa prototipo patógena XJ de virus Junin fue incorporada a la lista de virus inmunosupresores cuando pudo determinarse que alteraba algunas expresiones de la respuesta inmune [19, 21]. Por otra parte, experiencias similares con una cepa atenuada del virus Junin, la $XJCl_3$[10] estudiando su acción, sobre la producción de anticuerpos a antígenos heterólogos puso en evidencia diferencias de comportamiento con la patógena que podían ser utilizadas como marcadores de atenuación. En base a estos datos el presente trabajo fue diseñado para investigar el efecto que sobre la respuesta inmune humoral y celular del cobayo producían: la cepa $XJCl_3$ y la variante XJ_0, ambas atenuadas comparándolas con la producida, en iguales condiciones experimentales, con la cepa patógena. Estas experiencias tienden a aportar otros parámetros a los ya empleados, para valorar la atenuación de cepas o variantes del virus Junin con posibilidades de ser empleadas como antígeno vacunante contra la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA).

— — — —

Recibido: 25-IX-1980. Aceptado: 16-X-1980.

° Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

°° Becario de la SECYT (Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología).

°°° Miembro de la Carrera del Técnico del CONICET.

Dirección postal: Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, piso 12º, 1121 Buenos Aires, Argentina.

Materiales y métodos

Animales: Cobayos cuyos pesos oscilaron entre 300 y 400 g fueron inoculados por vía intramuscular (im) con 1000 DL_{50} contenidas en 0.2 ml de medio de Hanks, de los diferentes virus empleados.

Virus Junin: Cepa prototipo XJ patógena y atenuadas $XJCl_3$ y XJ_0. Ambas derivan originariamente de la XJ en pasaje C2 R11. La primera, fue clonada en células MA 111 (línea heteroploide

de riñón de conejo) en el Laboratory of Tropical Virology, USA, La XJ_0 luego de cinco pasajes sucesivos en cerebro de ratón lactante realizados en la Rockfeller Foundation (C2 R16) fue liofilizada y conservada a $-60°$ C.

Los stocks utilizados se prepararon en todos los casos a partir de cerebro de ratón lactante, homogeneizados al 10 % en solución de Hanks conteniendo 10 % de suero de ternera inactivado, fraccionados y conservados a $-70°$ C.

Los títulos obtenidos en ratón lactante fueron: $10^{7.8}$, $10^{8.9}$ y $10^{8.2}$ DL_{50}/ml para los virus XJ, $XJCl_3$ y XJ_0, respectivamente.

Investigación de virus y anticuerpos neutralizantes: La determinación de virus se realizó en ganglios linfáticos con técnicas in vitro empleando células Vero e in vivo por pasaje ciego en ratón lactante de 48-72 h de vida.

Para el título de anticuerpos neutralizantes se emplearon también células Vero inoculadas con una dosis constante de virus (4×10^2 $DICT_{50}$/0.2 ml) y diluciones seriadas de muestras de suero obtenidas a los 35 días de los animales sobrevivientes a la infección viral. Se tomó como título la inversa de la dilución que neutralizó el 50 % de la acción citopatogénica del virus.

Cuantificación de células formadoras de anticuerpos (CFP): Se empleó como antígeno glóbulos rojos de carnero (GRC) los que se administraron por vía intraplantar en cada una de las patas posteriores de los animales en estudio (0.2 ml de un sedimento conteniendo aproximadamente 3×10^9 GRC/ml, lavados previamente tres veces con solución fisiológica (SF).

En los grupos que correspondía, los GRC fueron inoculados 24 horas después de la infección viral. A los 7, 10, 16 y 21 días post-infección (pi), los animales se sacrificaron, extrayéndose ganglios poplíteos para determinar en ellos las células formadoras de anticuerpos y en las muestras del día 10 pi para aislamiento viral.

Los cobayos se dividieron en 4 grupos experimentales:

Grupo GRC: control de GRC sin infectar.

Grupo XJ-GRC: infectados con la cepa XJ e inoculados 24 h después con GRC.

Grupo $XJCl_3$ - GRC: infectados con la cepa $XJCl_3$ e inoculados con GRC.

Grupo XJ_0 - GRC: infectados con la variante XJ_0 e inoculados con GRC.

Para la cuantificación de CFP se utilizó la técnica de formación de placas directas en gel (método de Jerne) [12], con algunas modificaciones.

En lugar de bazo como describe la técnica original se utilizaron células de ganglios poplíteos a una concentración de 24×10^6 cel/ml.

Los GRC empleados en todos los casos provenían de un mismo animal y se almacenaban a 4° C durante 2 a 4 semanas antes de ser usados. A tubos de hemólisis mantenidos a 45-46° C conteniendo 0.8 ml de agarosa fundida al 0.7 % (L'Industrie Biologique Française) se les adicionó 0.25 ml de la suspensión de células y 0.15 ml de GRC al 20 %. La suspensión células-GRC fue vertida en cápsulas de Petri (Falcon Plastic, Oxnard, Calif) de 3 cm de diámetro que contenían 2 ml de agarosa base al 1.4 % en SF ya solidificada. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Las placas se incubaron durante una hora a 37° C y al cabo de ese tiempo se les agregó como fuente de complemento suero de cobayo con un título de 1/200 diluido 1 : 10 en líquido de Hanks. Luego de ser reincubadas a 37° C durante una hora y media se contaron en cada cápsula el número de placas de hemólisis.

En cada grupo experimental y para cada uno de los tiempos se emplearon entre 3-4 animales.

Respuesta sérica a ovoalbúmina (OA): Los cobayos recibieron por vía subcutánea (sc) dos dosis de 2 mg c/u de OA liofilizada en adyuvante completo de Freund, separadas por un intervalo de 7 días. Seis días después de la primera dosis de OA, distintos lotes de animales fueron infectados con los diferentes virus, los que se sangraron en los días 6, 8, 11, 18 y 28 pi para la detección de anticuerpos precipitantes antiovoalbúmina. Animales inoculados con OA solamente sirvieron de control.

La técnica de precipitación cuantitativa se realizó mediante la metodología habitual. A diluciones seriadas de los sueros se les agregaron cantidades iguales de antígeno (200 microgramos contenidos en 0.45 ml de PBS). Luego de una hora de incubación a 37° C los tubos fueron centrifugados 10 minutos a 3000 rpm y la lectura se efectuó al día siguiente.

Hipersensibilidad de contacto: Antígeno: 2-4 Dinitro-1-fluorbenceno (DNFB) diluido en una solución 4 : 1 de acetona-alcohol.

Se empleó como dosis sensibilizante: 0.02 ml de una solución de DNFB al 10 %, distribuido en una pequeña área del abdomen previamente depilado. Siete días después se aplicó en la cara externa de la oreja izquierda de los animales, 0.02 ml de una solución al 0.5 % de DNFB, como dosis desencadenante.

Para esta investigación los animales fueron distribuidos en diferentes grupos. Aquellos que fueron infectados recibieron el virus 3 días antes de la dosis sensibilizante. Un grupo sin infección viral y otro que recibió sólo la dosis desencadenante sirvieron de control.

Como sistema de lectura se utilizó un calibre radial marca "Oditest"-Germany, midiendo el grosor de las orejas previamente a la sensibilización y 24 a 48 h luego de la dosis desencadenante. Las lecturas se expresan como el índice entre el grosor de la oreja izquierda sobre el de la oreja derecha (OI/OD).

Todos los cobayos sobrevivientes a la inoculación con los virus atenuados ($XJCl_3$ y XJ_0) y sus respectivos controles fueron sangrados a los 30-35 días pi para la determinación de anticuerpos neutralizantes, y a los 60 días pi recibieron un desafío de 1000 DL_{50} de la cepa patógena XJ por vía im. Se observaron durante un período suplementario de 40 días.

Resultados

Con nuestro método de trabajo la infección de los cobayos por vía im con los

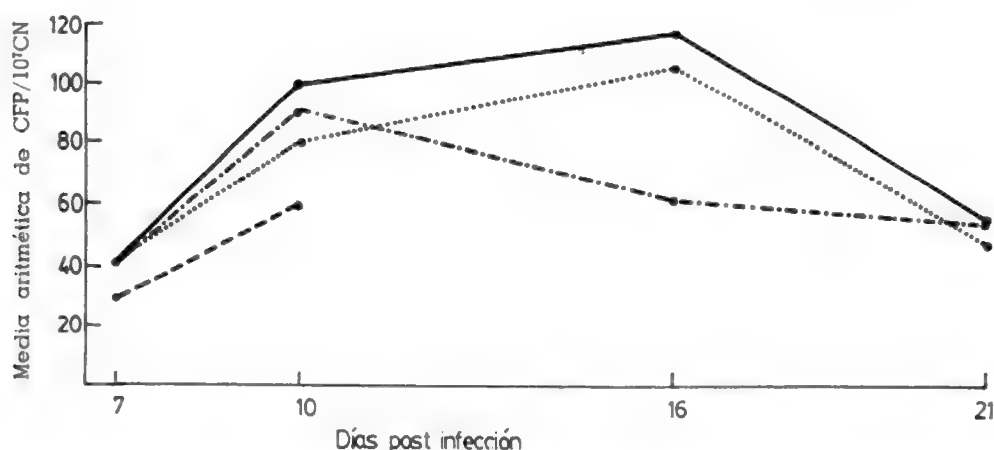


Fig. 1. — Media aritmética de CFP/10^7 células nucleadas (CN) del ganglio poplíteo de cobayos inmunizados en la almohadilla plantar con 6 x 10^8 GRC e infectados 24 h antes con las distintas cepas de virus Junin: ●———● Animales inmunizados (grupo control GRC); ●— — —● Animales inmunizados e infectados con virus Junin cepa XJ (grupo XJ-GRC); ●- - - - -● Animales inmunizados e infectados con virus Junin variante XJ_0 (grupo XJ_0-GRC); ●—.—.—.—● Animales inmunizados e infectados con virus Junin cepa $XJCl_3$ (grupo $XJCl_3$-GRC).

distintos virus empleados registró una mortalidad del 100 %, 20 % y 18.5 % para la cepa patógena XJ y las atenuadas XJ_0 y $XJCl_3$, respectivamente.

Todos los animales sobrevivientes de los dos últimos grupos resistieron la descarga de 10^3 DL_{50} de virus Junin cepa XJ, lo que puso en evidencia la inmunización lograda con la primera administración viral.

Título de virus y anticuerpos neutralizantes: En las muestras provenientes de ganglios linfáticos a los 10 días pi de los animales infectados con la cepa patógena XJ, se aisló virus en títulos de alrededor de 3 log, tanto con la técnica de la monocapa en células Vero o in vivo por inoculación de los macerados en cerebro de ratones lactantes. En cambio, los materiales provenientes de cobayos inoculados con cualquiera de los virus atenuados resultó dificultosa, y sólo en muestras aisladas se pudo determinar la presencia de virus por pasaje ciego. Esto concuerda con los resultados obtenidos por otros autores [1, 5].

La titulación de anticuerpos neutralizantes en tres muestras de sueros (cada una de las cuales constituidas a su vez por una mezcla de tres sueros) obtenidas a los 35 días pi fue para los animales sobrevivientes infectados con la cepa $XJCl_3$ de: 1/960, 1/1280 y 1/1920, respectivamente, y para la XJ_0 de: 1/640, 1/1280 y 1/1920.

Cuantificación de CFP: La acción de los distintos virus empleados sobre la cinética de la respuesta de CFP, está representada en la Figura 1. Como puede observarse, en los animales controles inmunizados solamente con GRC se produce desde el día 6 post-inmunización un paulatino aumento del número de CFP, que alcanza su máximo al día 16.

Los animales del grupo XJ-GRC evidencian una disminución altamente significativa en su respuesta al antígeno, que se hace evidente con respecto al grupo control desde el día 7 pi ($0.01 > p > 0.001$), y que se mantiene con las mismas características depresivas en el día 10 pi ($p < 0.001$), más allá del cual los cobayos mueren como consecuencia de la infección viral.

Como puede observarse, los animales del grupo XJ_0-GRC responden a la formación de CFP de manera similar a los controles. Los estudios estadísticos no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0.8$; $p > 0.1$; $p > 0.6$; $p > 0.5$ en los días 7, 10, 16 y 21 pi, respectivamente). Una consideración especial merece la acción que produce la cepa $XJCl_3$. En los días 7 y 10 pi el número de CFP no difiere del grupo control GRC, pero en el día 16 pi el virus altera la producción de CFP. Las diferencias entre ambos grupos son levemente significativas ($0.1 > p > 0.05$). La observación de las tendencias de las dos curvas parecería indicar un grado de significación mayor que la que expresa el estudio estadístico, pero es necesario destacar que los valores individua-

TABLA 1. — *Acción de diferentes virus Junin sobre la producción de anticuerpos precipitantes anti-ovoalbúmina (OA)* [1]

	GRUPOS							
Días pi	OA	$\bar{X}$	XJ-OA	$\bar{X}$	XJ_0-OA	$\bar{X}$	$XJCl_3$-OA	$\bar{X}$
6	128		64		32		64	
	64	72.0	64	64.0	64		128	112.0
	32		64		64	70.4	128	
	64		64		64		128	
					128			
8	128		64		128		128	
	128		64	80.0	128		128	
	128	179.2	64		128	179.2	128	153.6
	256		128		256		128	
	256				256		256	
11	512		8		512		256	
	512		16	30.0	512		256	
	512	768.0	32		256		256	384 0
	1024		64		256	469.3	512	
	1024				256		512	
	1024				1024		512	
18	512				256		512	
	512	512.0	—		256	341.3	512	426.6
	512				512		256	
28	128				128		128	
	128	170.6	—		256	213.3	256	213.3
	256				256		256	

[1] Expresados como la inversa del título.

les de los animales inoculados con el virus $XJCl_3$ presentan notorias dispersiones, lo que puede ser explicado por diferencias en la intensidad de la acción viral sobre cada cobayo individualmente, ya que la cepa $XJCl_3$ produce en el cobayo distintas formas clínicas o subclínicas de infección [1].

Respuesta de anticuerpos precipitantes: La acción que la infección viral produjo sobre la capacidad de los cobayos de responder inmunológicamente a un antígeno soluble, fue puesta en evidencia con la administración de OA. Como muestra la Tabla 1 los animales controles sin infección, tienen una respuesta que alcanza su pico máximo a los 17 días de la primera inoculación de OA (11 pi; $\bar{X} = 768.0$) disminuyendo paulatinamente a los 24 (18 pi; $\bar{X} = 512.0$) y 34 (28 pi; $\bar{X} = 170.6$).

El análisis de los resultados obtenidos, demuestra que no existen diferencias en los títulos de anticuerpos precipitantes entre ninguno de los grupos estudiados con respecto al control en los estadíos tempranos de la infección viral. En el 6º día pi la significación estadística fluctuó entre $p > 0.7$, $p > 0.4$ y $p > 0.1$ para XJ, XJ_0 y $XJCl_3$, respectivamente.

En el día 8 pi comienza a hacerse evidente el deterioro inmunológico en el grupo de animales inoculados con la cepa patógena ($0.01 > p > 0.001$) que se mantiene con el mismo grado de significación en el día 11 pi, período en el que los animales muestran evidentes signos de enfermedad y la mortalidad es alta.

La infección con las cepas atenuadas, en cambio, no parece afectar la capacidad de desarrollar anticuerpos precipitantes en los tiempos estudiados en esta experiencia. Hacen excepción a esto los títulos obtenidos en el día 11 pi, provenientes de los cobayos infectados con $XJCl_3$, donde se observa un cierto grado de inhibición ($0.02 > p > 0.01$).)

Esto es coincidente con el período en que también el número de las células formadoras de anticuerpos hacia GRC sufre una caída. En ambos casos los animales parecen superar la transitoria inmunosu-

presión para alcanzar luego valores similares a los de los respectivos controles.

Hipersensibilidad de contacto al DNFB: En la Tabla 2 están registrados los resultados obtenidos en los distintos grupos experimentales, expresados como el índice del espesor de la OI/OD.

Como puede observarse, todas las mediciones realizadas previamente a la descarga, tanto en los controles como en los grupos sensibilizados, no difieren entre sí. El grupo control de la sensibilidad de contacto al DNFB, mostró un incremento en el índice superior al 60 % a las 24 h posteriores a la descarga, que disminuye ligeramente a las 48 h.

Valores similares fueron obtenidos en los grupos que se infectaron con la cepa $XJCl_3$ y la variante XJ_0. En cambio, se hace evidente la inmunosupresión que sufren los cobayos que recibieron la dosis letal de la cepa patógena. Cabe señalar, que estos valores deben ser superiores a la realidad media, teniendo en cuenta que la medición se está realizando en aquellos cobayos sobrevivientes, es decir, que superan el día 11 y 12 de la infección viral.

Discusión

Una de las reales conquistas del hombre, en los últimos cien años, ha sido la posibilidad de reducir la incidencia de las enfermedades infecciosas con el empleo de la vacunación. En el caso de las enfermedades virales, los mayores éxitos han sido logrados, sin duda, utilizando cepas viables atenuadas. Su principal ventaja frente al empleo de virus inactivados, se basa en que la multiplicación viral conduce a un aumento de la masa antigénica, logrando con ello una prolongada inmunización que puede llegar a ser similar en magnitud a la que ocurre en las infecciones subclínicas naturales. Sin embargo, por tratarse de un microorganismo vivo, deben extremarse los estudios previos que conduzcan a certificar la real atenuación de la cepa empleada.

Muchos son los métodos propuestos como pautas de atenuación de una cepa viral que eventualmente pueda ser utilizada como vacuna [14]. Los hallazgos que se describen en el presente trabajo, obtenidos

TABLA 2. — *Acción de los diferentes virus Junin sobre la hipersensibilidad de contacto al 2-4 dinitro-1-fluorbenceno (DNFB)* [1]

		GRUPOS					
Días pi		Normal (control)	Descarga DNFB (control)	Sensibilizado y desencadenado (control)	Sensibilizado y desencadenado + XJ	Sensibilizado y desencadenado + XJ_0	Sensibilizado y desencadenado + XJC_3
10 (previo descarga)	$\bar{X}$	1.015 (24)	1.020 (6)	1.009 (6)	1.001 (6)	1.012 (6)	1.013 (6)
	DS	± 0.044	± 0.044	± 0.040	± 0.024	± 0.034	± 0.011
11 (24 h)	$\bar{X}$	—	1.090 (6)	1.644 (6)	1.147 (5)	1.746 (6)	1.558 (6)
	DS		± 0.088	± 0.068	± 0.143	± 0.299	± 0.109
12 (48 h)	$\bar{X}$	—	1.059 (6)	1.327 (6)	1.202 (3)	1.357 (6)	1.257 (6)
	DS		± 0.059	± 0.048	± 0.116	± 0.160	± 0.075

[1], Se expresa como el índice entre el engrosamiento de la oreja izquierda (desencadenada) en relación al engrosamiento de la oreja derecha (OI/OD); $\bar{X}$, media aritmética; DS, desviación standard; los número entre paréntesis corresponden al número de animales ensayados. En el grupo infectado con la cepa XJ la diferencia en el número de animales en los días 11 y 12 pi se debe a la mortalidad provocada por la acción viral.

en el cobayo con virus Junin de diferente grado de patogenicidad, autorizan a pensar que es posible emplear la respuesta inmunológica como un nuevo parámetro de atenuación. En nuestro modelo experimental, esto es válido para el número de células formadoras de anticuerpos a antígenos particulados (GRC), solubles (OA), así como para la expresión cutánea de la inmunidad mediada por células empleando el DNFB.

En la cuantificación de CFA se empleó el ganglio poplíteo, ya que por razones virológicas e inmunológicas resultaba uno de los mejores materiales para poner en evidencia los fines propuestos. Ha sido demostrado que después de la inoculación de hematíes de carnero en la almohadilla plantar, es el ganglio satélite el sitio donde se sintetiza la mayor cantidad de anticuerpos [13, 17]. Además, el hecho de que el virus pueda localizarse en ganglios linfáticos cuando se inocula, como en nuestro caso, por vía im, permitiría valorar su acción local. La replicación viral, sin embargo, es variable, ya que la cepa XJ patógena es fácilmente detectable, alcanzando títulos de alrededor de 3 logs, la $XJCl_3$ ha sido aislada cuando se administran altas dosis de virus [1] y la variante XJ_0 es difícilmente detectable [5]. El estudio por microscopía óptica y electrónica de la acción de la cepa patógena sobre el ganglio linfático, pone en evidencia importantes alteraciones celulares consistentes en condensación cromatínica, edema mitocondrial, aumento en el número de vacuolas autofágicas y completa desorganización tisular [25].

Los resultados que se presentan en esta comunicación, muestran una significativa reducción en el número de CFP en los animales inoculados con la cepa XJ patógena, si se la compara con los controles sin infección viral (7º y 10º día pi; $0.01 > p > 0.001$). Por el contrario, con los virus atenuados la inmunosupresión es menos marcada con respecto a los mismos controles, aunque las diferencias en la significación son variables entre ellas. De ambas, la variante XJ_0 altera en menor magnitud esta respuesta inmunológica, ya que en todos los tiempos estudiados los valores de p siempre fueron superiores a 0.1. Es de hacer notar que la cepa $XJCl_3$ si bien se comporta de manera similar a la XJ_0 en los días 7, 10 y 21 pi, en las muestras correspondientes al día 16 pi se observa una diferencia levemente significativa con los controles ($0.1 > p > 0.05$), lo que coincide con la mayor replicación del virus $XJCl_3$ en ganglios linfáticos [1].

Lo dicho hasta aquí en lo que se refiere al número de CFP, es válido también en los diferentes grupos experimentales para el título de anticuerpos séricos precipitantes antiovoalbúmina.

En lo que se refiere a la inmunidad mediada por células, su supresión ha sido asociada con infecciones virales, como es el caso del sarampión, paperas, influenza en el hombre, y con el virus de la leucemia de Friend en animales [4, 15, 16, 24]. Esta inmunosupresión está disminuida o ausente cuando se utilizan vacunas a virus atenuados o inactivados. El empleo de cepas vivas atenuadas del virus de la poliomielitis y de la fiebre amarilla, producen solamente una leve alteración en el tamaño de la reacción tuberculínica [2], mientras que no existen modificaciones de la respuesta cuando se utilizan, por ejemplo, vacunas con virus inactivados de sarampión [8, 27]. Agentes químicos simples como el DNFB, proveen un sistema adecuado para el estudio de la hipersensibilidad de contacto, más aún luego que Frenkel [9], en el terreno experimental, describió un sistema que permite una rigurosa cuantificación del fenómeno por el método del engrosamiento de la oreja del animal sensibilizado en estudio.

Nuestros resultados, utilizando cepas atenuadas de virus Junin en el cobayo, apoyan estas observaciones, ya que también aquí la infección con la cepa XJ patógena anula la respuesta cutánea al DNFB, mientras que con las cepas atenuadas, las reacciones en nada difieren de las obtenidas en los animales sensibilizados sin infección viral. En el análisis de las causas que motivan estas diferencias entre las distintas cepas virales en estudio, es interesante destacar algunos aspectos. Como ya ha sido mencionado, los tres virus presentan diferencias en lo que se refiere a invasividad y multiplicación en los órganos del cobayo. Mientras la cepa XJ puede ser aislada, alcanzando altos títulos, en prácticamente todos los tejidos [11], la

$XJCl_3$ muestra menor invasividad y capacidad de replicación [1] y la XJ_0 es sólo ocasionalmente aislada de algunos órganos [5]. Esto sería coincidente con los hallazgos de Penhale [22], cuando afirma que la depresión inmunológica se establece en las infecciones que van acompañadas de franca multiplicación viral en los órganos comprometidos en la respuesta inmune, mientras que cuando el virus falla en multiplicarse los fenómenos inmunológicos no son afectados.

Otras observaciones, que deben ser consideradas y ligadas a lo anterior, es la intensa linfopenia que produce el virus XJ patógeno sobre sangre periférica [18], que compromete por igual a las poblaciones T y B [7]. La linfopenia es leve, tanto con la cepa $XJCl_3$ [18] como en los animales infectados con la XJ_0 [5]. Es posible, entonces, que la disminución de los linfocitos circulantes sea el mecanismo operativo de la supresión de la respuesta al DNFB, mientras que la merma de células comprometidas en la respuesta inmune a nivel de ganglio [7], producto de la intensa replicación viral en el caso de la cepa XJ, afecte los mecanismos inmunológicos humorales estudiados en el presente trabajo.

La carencia de inmunosupresión, cuando se utilizaron cepas atenuadas de virus Junin, nos permiten sugerir que el estudio experimental de los fenómenos inmunológicos puede constituir un aporte a la caracterización de una cepa viral, con posibilidades de ser empleada como antígeno vacunante.

Resumen

Se estudió en cobayos el efecto que sobre la respuesta inmune hacia antígenos no relacionados producía la infección con distintas cepas de virus Junin. Se emplearon la cepa XJ patógena (100 % mortalidad) la $XJCl_3$ y la variante XJ_0, estas últimas atenuadas (mortalidad alrededor del 20 %). En todos los casos, los animales fueron infectados con 10^3 DL_{50} por vía intramuscular. Se investigó el número de células formadoras de anticuerpos (CFP) a glóbulos rojos de carnero por el método de Jerne, anticuerpos séricos precipitantes a ovoalbúmina (OA), y la hipersensibilidad de contacto al 2-4 dinitro-1-fluorbenceno (DNFB). La acción de los distintos virus empleados sobre la cinética de CFP, demostró en el grupo de animales infectados con la cepa patógena XJ una evidente disminución en la respuesta, con respecto al grupo control sin infección ($p < 0.001$), tanto a los 7 como a los 10 días post-infección. Esta inmunosupresión no se observa en los grupos infectados con los virus atenuados. Resultados similares fueron registrados cuando se determinó el título de anticuerpos séricos precipitantes antiovoalbúmina. La infección con la cepa XJ patógena anuló la respuesta cutánea al DNFB, mientras que con los virus atenuados las reacciones no difirieron de las obtenidas en los animales sensibilizados que sirvieron de control. Se postula que las diferencias en lo que se refiere a invasividad y capacidad de replicación de los distintos virus empleados, así como las alteraciones hematológicas y la de los órganos comprometidos en la respuesta inmune, pueden ser responsables de las diferencias observadas. Estas experiencias tienden a aportar otros parámetros a los ya empleados para valorar la atenuación de cepas o variantes del virus Junin con posibilidades de ser empleadas como antígeno vacunante contra la FHA.

Summary

IMMUNOLOGIC MARKERS OF VIRAL ATTENUATION IN GUINEA PIGS INFECTED WITH JUNIN VIRUS VARIANTS.

Infectious agents, in particular several different viruses, depress the immunologic competence of the infected host with regard to unrelated antigens. This effect has been observed principally with oncogenic viruses, although non-oncogenic viruses, such as measles, mumps, cytomegalovirus, are also able to affect the immunologic response. However, the use of live attenuated virus was found to cause only a slight decrease of the immunological response and no effect was induced by killed virus. As shown in previous papers, guinea pigs experimentally infected with XJ pathogenic strain of Junin virus (100 % mortality) have a decreased immune res-

ponse to many heterologous antigens. On the other hand, the attenuated strain of Junin virus, $XJCl_3$, yielded a different response when compared with the pathogenic strain, when studying antibody forming cells by the immunocytoadherence method. In the present study, attempts were therefore made to investigate the effect on the immune function of the pathogenic strain, XJ prototype of Junin virus, and two attenuated strains. Both XJ_0 and $XJCl_3$ (attenuated, approximately 20 % mortality) were derived from the same line of XJ strain. The $XJCl_3$ was obtained by cloning the pathogenic strain and the XJ_0 is a Junin virus variant. The main difference between the two resides in the fact that XJ_0 has no passage in heteroploid cells. Figure 1 shows the arithmetic means of direct plaque forming cells (PFC/10^7 nucleated cells) from the draining popliteal lymph nodes of guinea pigs infected and 24 h later, immunized in the footpad with sheep red blood cells. The animals were killed at various intervals after intramuscular infection with 10^3 LD_{50} of different Junin viruses. The number of PFC were considerably reduced in the XJ virus-infected animals in contrast with guinea pigs infected with the live attenuated virus. The serum titre of precipitating antibodies from guinea pigs treated with chicken ovoalbumin (OA) and infected with viruses are recorded in Table 1. As can be seen, only XJ virus infected guinea pigs failed to develop titres of antibodies comprable to control animals. As for contact hypersensitivity, guinea pigs were sensitized 3 days before infection, by percutaneous application of 2-4 dinitro 1-fluorbenzene; the results are expressed as an index between the thickness of the challenged ear over the contralateral one. As seen in Table 2, 24 hs after challenge, there were no significant differences between control, uninfected group and groups infected with attenuated viruses. By contrast, animals which received 10^3 LD_{50} of XJ Junin virus strain revealed a marked depression of the delayed hypersensitivity response. It was considered particularly significant that immunosuppression spread rapidly: guinea pigs in which infection was established with high virus multiplication, and cellular lesions, were depressed immunologically, whereas animals in which the virus "failed" to multiply were not affected. Even though the precise mechanism of the immunosuppression is not clear, the possibility that pathogenic Junin virus directly affects the reticuloendothelial system must be considered. These results provide a new parameter in order to evaluate the attenuation of a Junin virus strain, which may be used as a vaccine-antigen against Argentine Hemorrhagic Fever.

Agradecimientos: Este trabajo fue realizado con fondos provenientes de la Secretaría de Ciencia y Teconolgía, dependiente del Ministerio de Cultura y Educación de la Nación, y de la Comisión Coordinadora para el Estudio y Lucha contra la Fiebre Hemorrágica Argentina, dependiente de la Secretaría de Salud Pública de la Nación.

Bibliografía

1. Avila MM, Samoilovich SR, Weissenbacher MC: Infección del cobayo con la cepa atenuada del virus Junin $XJCl_3$. *Medicina (Bs Aires)* 39: 597, 1979.
2. Berkovich S, Starr S: Effects of live type I poliovirus vaccine and other viruses on the tuberculin skin test. *New Engl J Med* 274: 67, 1966.
3. Blair PB, Kripke ML, Lappé MA, Bonhag RS, Young L: Immunologic deficiency associated with mammary tumor virus (MTV) infection in mice: Hemagglutinin response and allograft survival. *J Immunol* 106: 364, 1971.
4. Bloomfield AL, Mateer JG: Changes in skin sensitiveness to tuberculin during epidemic influenza. *Am Rev Tuberc* 3: 166, 1919.
5. Boxaca MC, Guerrero LB de, Frigerio MJ, Rondinone SN, Rabinovich RD: Algunos aspectos de la infección experimental del cobayo con una nueva línea atenuada del virus Junin. *Medicina (Bs Aires)* 40: 521, 1980.
6. Bro-Jörgensen K, Volkert M: Defects in the Immune System of Mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Infect Immun* 9: 605, 1974.
7. Carballal G: El modelo cobayo en la FHA Epxerimental. *Ciencia e Investigación* 33: 225, 1977.
8. Fireman P, Friday G, Kumate J: Effect of measles vaccine on immunologic responsiveness. *Pediatrics* 43: 264, 1969.
9. Frenkel JK: Adoptive immunity to intracellular infection. *J Immunol* 98: 1309, 1967.
10. Frigerio MJ, Nota NR, Nejamkis MR, Bisso GM, Guerrero LB de: Estudios inmunológicos en Fiebre Hemorrágica Argentina Experimental. I. Intervención de una cepa atenuada del virus Junin en la respuesta inmunológica. *Medicina (Bs Aires)* 31: 161, 1971.

11. Guerrero LB de, Boxaca MC, Weissenbacher MC, Frigerio MJ: Infección experimental del cobayo con virus Junin. Cuadro clínico. Diseminación y eliminación del virus. *Medicina (Bs Aires)* 37: 271, 1977.
12. Jerne NK, Nordin AA: Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* 140: 405, 1963.
13. Jokipii AMM: The primary antibody response to sheep erythrocytes in the lymphoid organs of the guinea pig. *Ann Med exp Fenn* 48: 105, 1970.
14. Kantoch M: Markers and Vaccines. *Advanc virus Research* 22: 259, 1978.
15. Kupers TA, Petrich JM, Holloway AW, St Geme JW: Depression of tuberculin delayed hypersensitivity by live attenuated mumps virus. *J Pediat* 76: 716, 1970.
16. Mortensen RF, Ceglowski WS, Friedman H: Leukemia virus induced immunosuppression. *J Immunol* 111: 1810, 1973.
17. Nota NR, Frigerio MJ, Nejamkis MR, Derdak G, Ponzo O: Cytodynamique de la response immunitaire étudiée por la méthode de l'immunocytoadherence. *Ann Inst Pasteur* 115: 391, 1968.
18. Nota NR, Frigerio MJ, Guerrero LB de, Nejamkis MR: Estudio hematológico en cobayos infectados con virus Junin cepa XJ y cepa $XJCl_3$. *Medicina (Bs Aires)* 29: 171, 1969.
19. Nota NR, Frigerio MJ, Besuschio SC, Nejamkis MR, Bisso GM: Estudios inmunológicos en Fiebre Hemorrágica Argentina Experimental. III. Fenómeno de Arthus. *Medicina (Bs Aires)* 31: 170, 1971.
20. Osborn JE, Blazkovec AA, Walker DL: Immunosuppression during acute murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 100: 835, 1968.
21. Parodi AS, Nota NR, Guerrero LB de, Frigerio MJ, Weissenbacher M, Rey E: Inhibition of immune response in Experimental Hemorrhagic Fever (Junin virus). *Acta Virol* 11: 120, 1967.
22. Penhale WJ, Pow IA: The immunodepressive effect of rinderpest virus. *Clin exp Immunol* 6: 627, 1970.
23. Salaman MH: Immunodepression by viruses. *Antibiotica et Chemotherapia* 15: 393, 1969.
24. Starr S, Berkovich S: Effects of measles, gamma-globulin-modified measles and vaccine measles on the tuberculin test. *New Engl J Med* 270: 386, 1964.
25. Tkaczevski LZ de, Nota NR, Nejamkis MR, Frigerio MJ, Carballal G: Immunosuppression by Junin virus. Ultrastructural study. *Medicina (Bs Aires)* 34: 201, 1974.
26. Woodruff JF, Woodruff JJ: The effect of viral infections on the function of the immune system. *In:* Viral Immunology and Immunopathology. Ed Abner Louis Notkins. Academic Press, New York, 1975, p 393.
27. Woodruff JF, Woodruff JJ: T Lymphocyte interaction with viruses and virus-infected tissues. *Prog med Virol* 19: 120, 1975.

— — — —

No working scientist ever thinks of himself as old, and so long as health, rules of retirement, and fortune allow him to continue with research, he enjoys the young scientist's privilege of feeling himself born anew every morning.

Ningún científico en actividad se considera viejo y en tanto su salud, las leyes jubilatorias y su fortuna le permitan continuar investigando, goza del privilegio de los científicos jóvenes de sentirse renacido cada mañana.

PETER B. MEDAWAR

Advice to a young scientist, Harper & Row, 1979

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 53-59 (1981)

PARTIAL RESISTANCE TO METHEMOGLUBIN-INDUCED ACUTE RENAL FAILURE IN RATS RECOVERING FROM PRIOR RENAL FAILURE

ROLE OF URINARY KALLIKREIN *

R. MARTIN **, ELVIRA E. ARRIZURIETA DE MUCHNIK **

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Hayes et al [5] have reported that animals recovering from glycerol-induced acute renal failure (ARF) are resistant to a subsequent glycerol injection given 7 to 35 days after the first. The basis for this protection has not been firmly established. On the other hand, it is well know that resistance to ARF in saline drinking animals is associated with low levels of both plasma renin activity and renal renin content [8]. However, Oken et al [11] and Carvalho et al [3] were not able to find a depletion of renal renin content or an abnormal renin release while rats were effectively protected from a second episode of ARF. In a previous work we found that protection against a single episode of ARF was obtained when a high urinary kallikrein excretion (UK) effected by a high sodium diet was present before inducing the disease [6], suggesting a pathogenic role for the kallikrein-kinin system. Therefore the present study was designed to investigate if methemoglobin-induced ARF is followed by a resistance to a new episode of ARF and to test the hypothesis of a protective role of UK in this model. The results showed that a first episode of ARF affords a partial resistance to a second one, that UK can not be regarded as a protective factor and that an increase in water and solute excretion rate prior to the second episode provided by an incomplete recovery from the first, seems to play a major role in that protection.

Material and methods

Forty five female Wistar rats, with an average weight of 184.7 ± 33.9 g (mean ± SD) were divided into two groups. The first group (36 animals) underwent a twenty-four hour urine collection in individual cages with free access to water. Immediately thereafter, the animals were dehydrated during 48 hours with free access to food and received human methemoglobin (0.125 g/kg body weight) in order to induce an ARF, as previously described [12]. Ten days after the first methemoglobin injection, a new 24 hour-urine collection was performed in the surviving rats and they were rechallenged with methemoglobin once again (0.125 g/kg actual body weight), in order to induce a second episode of ARF. To measure plasma urea, blood was collected from tail vein into heparinized tubes immediately before each methemoglobin injection and 48 hours thereafter. In both 24 hour-urine collections previous to the first and second episode, urine flow rate and urea,

— — — —

Received: 20-VIII-1980. Acepted: 3-IX-1980.

* Presented at the XXIV Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, November 1979.

** Member of the Research Career, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Buenos Aires, Argentina).

Postal address: Instituto de Investigaciones Médicas, Donato Alvarez 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina.

electrolyte, osmolal and UK excretion were evaluated. The dose of methemoglobin employed in both instances was reduced to a quarter of the dose commonly used in order to avoid a high mortality.

The second group (9 animals) was treated as the first, except that it received a saline injection instead of methemoglobin and was used as control.

Plasma and urinary urea were measured enzymatically. UK was determined by a modification of Nustad's colorimetric method [10], as previously described [7] and results were expressed in micromoles (μM) of tosylarginine-methyl-ester (TAMe) consumed. Urinary electrolytes and osmolality were measured by an IL flame photometer and a Fiske osmometer respectively. Data were expressed as mean ± SD. Paired t test and linear regression by the least-square method were performed for analyses of significance. A p value lower than 0.05 was considered to be statistically signficant [17].

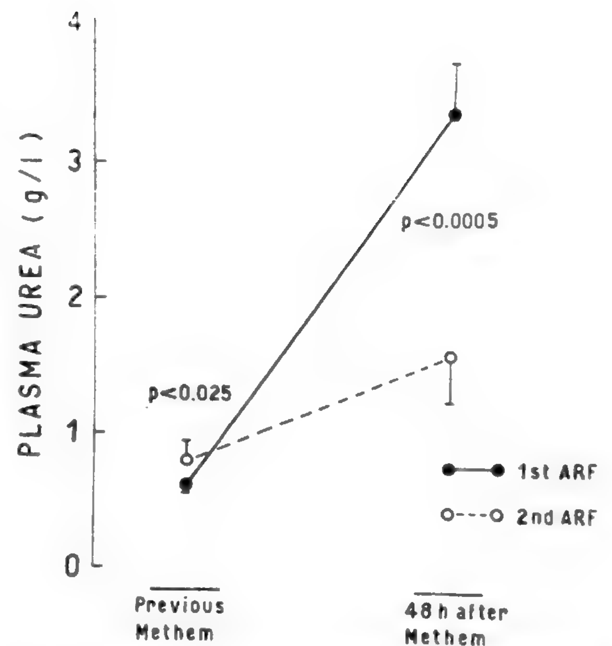


Fig. 1. — Changes from control values in plasma urea levels 48 h after methemoglobin injection in the first and second ARF episodes.

Results

After the first methemoglobin injection, 12 out of 36 animals died (33.3 %). Instead, only 2 out of the 24 survivors (8.3 %) died after the second methemoglobin injection. The increase of plasma urea (P_u) in both episodes is shown in Figure 1. As can be seen, P_u 48 h after the first methemoglobin injection was 2.2 times greater than after the second one ($p < 0.005$). Recovery from the first episode of ARF was not complete, as shown in Table 1, P_u immediately before the second methemoglobin injection was significantly higher than that recorded initially ($p < 0.025$), while urinary osmolality still was 35 % lower ($p < 0.025$). In spite of these findings, urea clearance (C_u) before the second episode was similar to that recorded before the first one. This fact could be partially accounted for by the 53 % increase in urea excretion which followed the 2.6 times increase in urine flow rate. Likewise, osmolal excretion augmented 1.7 times. In order to assess the magnitude of changes of urea excretion induced by the above mentioned increase in the urine flow rate, five additional rats were studied before and after a single

TABLA 1. — *Plasma and urinary values before first and second acute renal failure (ARF)*

	Before 1st ARF	Before 2nd ARF	P
Plasma urea (g/l)	0.56 ± 0.20	0.81 ± 0.43	< 0.025
Urinary osmolality (mOsm/kg H_2O)	1540.4 ± 929.5	1007.1 ± 381.4	< 0.025
Urea clearance μl/min/100 g)	159.6 ± 98.9	160.6 ± 77.9	N.S.
Urinary urea (mg/100 g/24 h)	112.5 ± 66.4	172.4 ± 68.4	< 0.01
Urine flow rate (ml/100 g/24 h)	3.1 ± 3.1	8.1 ± 3.6	< 0.0005
Osmolal excretion (μOsm/100 g/24 h)	4.5 ± 2.2	7.7 ± 2.7	< 0.0005

Values are means ± S.D.

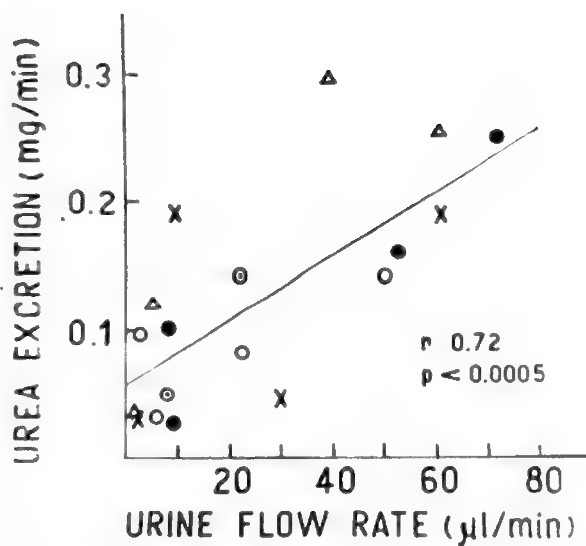


Fig. 2. — Changes in urea excretion with variation of urine flow rate. Each symbol represents a given animal evaluated at different times after water loading (5 rats).

water loading given by gavage. The data obtained (Fig. 2), effectively showed that when urine flow rate increased 2.6 times, a 20 % higher urea excretion was observed. UK excretion amounted 123.54 ± 69.43 and 89.16 ± 70.79 µM/24 h/100 g body weight before the first and second episode respectively. This difference was not statistically significant but, if UK was factored by C_u the values become still significantly lower before the second episode, 0.61 ± 0.27 and 0.32 ± 0.24 µM/100 g/24 h/ml C_u ($p < 0.0025$, Fig. 3). C_u was

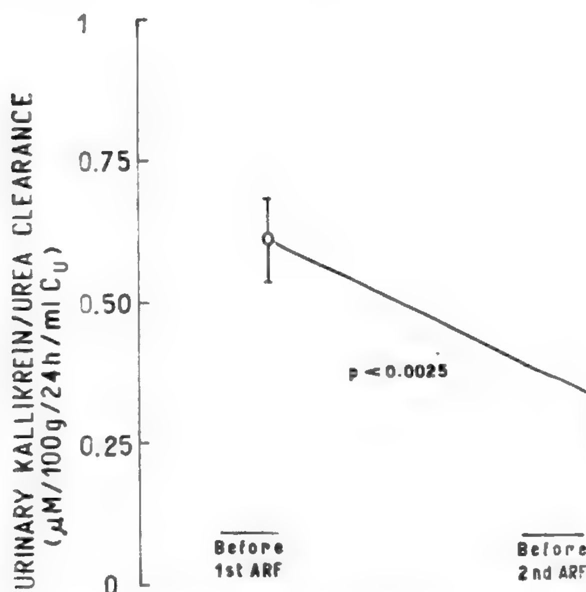


Fig. 3. — Urinary kallikrein excretion related to urea clearance previous to first and second ARF episodes.

taken as an indicator of remnant kidney function.

When urine flow rate previous to the second episode of ARF was related to 48 h P_u value of the second episode, a significant inverse correlation was found ($r = 0.60$, $p < 0.0025$, Fig. 4). Similar significant correlations were present between 48 h P_u and sodium ($r = 0.55$, $p < 0.0005$) and solute excretion ($r = 0.47$, $p < 0.0025$) previous to the second episode. On the contrary, no correlation was found when urine flow rate, sodium and solute excretion previous to the first episode were plotted against 48 h P_u after the first episode of ARF ($r = 0.03$, 0.09 and 0.009, respectively).

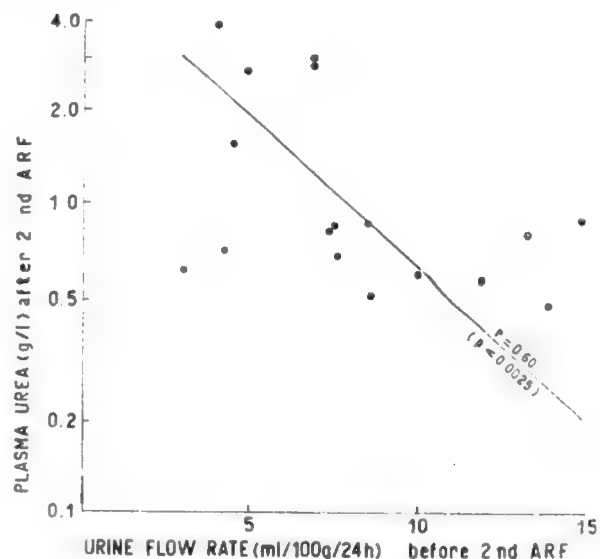


Fig. 4. — Interelations hip between 48 h P_μ of second ARF episode and previous urine flow rate.

Finally, as shown in Table 2, values for control rats, which received saline instead of methemoglobin did not differ between them.

Discussion

Our data of a diminished mortality and a lesser degree of P_u increase after the second ARF, clearly indicate that an episode of ARF induced by methemoglobin affords a partial protection against a second one in the same animal. Protection against a second episode of ARF has also been described in rats treated alternatively with $HgCl_2$ and glycerol[11]. For all these reasons, it seems to be fairly esta-

TABLE 2. — *Plasma and urinary values before first and second saline injection*

	Before 1st saline injection	Before 2nd saline injection	P
Plasma urea (g/l)	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	N.S.
Urinary osmolality (mOsm/kg H_2O)	1331.0 ± 621.1	1553.5 ± 891.9	N.S.
Urea clearance (μl/min/100 g)	176.4 ± 55.4	186.8 ± 113.9	N.S.
Urinary urea (mg/100 g/24 h)	93.1 ± 47.5	75.1 ± 50.3	N.S.
Urine flow rate (ml/100 g/24 h)	2.7 ± 1.5	2.3 ± 1.8	N.S.
UK (μM/24 h/100 g)	137.0 ± 62.0	122.3 ± 97.5	N.S.
UK (μM/24 h/100 g/ml C_u)	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.8	N.S.

Values are means ± S.D.

blished that resistance to a second episode of ARF does not depend on the agent used to induce the disease, but on some non-specific phenomenon common to all investigated models. Differences in degrees of renal function impairment after methemoglobin injection between both episodes could theoretically be accounted for by a decrease of pigment arriving to the kidney secondary to a diminished renal blood flow before the second episode. Although renal blood flow has not been measured in the recovery phase of methemoglobin induced ARF, it is known that directly measured renal blood flow recovers to control values as soon as 24 h after thirty minutes renal artery clamping + hematin [13] and also that, in experiments where ARF was induced by potassium dichromate, renal blood flow returned to normal values during the interval between the 7th and 14th days after the beginning of the disease [16]. Consequently, it is tempting to discard a decrease in the methemoglobin load to the kidney as a cause for the milder degree of ARF after second methemoglobin injection. Measurements of renal blood flow in the recovery phase of the methemoglobin model are necessary to approach further this question. On the other hand, differences in P_u after both episodes could not only be interpreted as the result of dissimilar degrees of renal function impairment but also as a decrease in urea load secondary to a decrease in nitrogen ingestion. Data coming from experiments in progress (9 rats) where food ingestion was daily evaluated have shown that by the 10th day after 1st ARF, the food intake did not differ from the values recorded in the control period (11 ± 4.77 and 12.33 ± 3.79 g/24h for the control and 10th day after the first episode respectively). Consequently, we believe that diminished P_u values after the second episode of ARF can be indirectly adscribed to a lesser degree of renal damage and not to differences in urea load to body water. Our finding of a partial protection against a second episode of ARF, in contrast with the total protection found by others [3, 5, 11], depends probably on the toxic employed, its dosage and the timing of the second injection.

The search for a mechanism for this protection could be approached by considering other experimental conditions associated with resistance to ARF. In this regard chronic salt loading effectively prevents rats from developing ARF when challenged with a variety of noxious stimuli [6, 8]. Although the decrease of activity of the renin-angiotensin system secondary to sodium loading has been considered as a possible determinant [8] different lines of evidence have not confirmed this hypothesis [1]. Carvalho et al [3] recently demonstrated normal renin release in rats recovering from myohemoglobinuric ARF, strongly suggesting that resistance to a second episode of ARF does not depend on an inhibition of the renin-angiotensin system.

In a previous work[6], we found that chronic salt loading was associated with high UK excretion and with protection against methemoglobin induced ARF. Therefore we suggested that ARF could be mediated by a deficiency of renal vasodilator substances such as those of the kallikrein-kinin system. Present results do not confirm this hypothesis since UK excretion was similar previous to both ARF episodes and even significantly decreased, when expressed in relation to C_u before the second one (Fig. 3). We considered C_u as an approximative index of functioning parenchyma and used it to express the results for UK excretion. However, caution must be taken in considering C_u as a comparable expression of equivalent nephron function in both instances. Since an increase in urine flow rate may determine by itself a higher urea excretion (Fig. 2), the lack of change in C_u previous to second ARF episode (when urine flow was increased 2.6 times) would be interpreted as a diminution of GFR. Even considering a theoretical 20 % fall in GFR, UK excretion/C_u was lower before second ARF. On the other hand, UK excretion has been taken as an indirect measure of renal kallikrein content in physiological conditions[9] but, since it is not known if intrarenal handling of kallikrein is altered in ARF, one can not definitively exclude the possibility of a high renal kallikrein content as a mechanism for the partial protection found. Taking into account these considerations, our data indicate that partial protection against a second episode of ARF is not probably due to an enhanced activity of the renal kallikrein-kinin system and that the diminished UK excretion/C^9 found by us should be viewed as a consequence of the renal damage induced by the first methemoglobin injection.

The second approach in looking for a mechanism for the partial protection described is by focusing on those parameters measured before the second methemoglobin injection. The finding of a significant inverse correlation between the intensity of the second episode of ARF and the urine flow rate (Fig. 4) and solute excretion immediately before the methemoglobin injection point out that protection against ARF could merely have been due to an augmented solute diuresis before the second episode. This fact has also been recognized in models in which the protection in a single episode of ARF was associated with natriuresis induced by saline drinking[2] and furosemide[18]. The same mechanism can probably account for the alleviation of ARF, when it is provoked after a reduction of renal mass[14], since a high solute diuresis is consistently found in this situation. The increased solute excretion found in our experiments before the second episode, probably resulted from an incomplete filtrate reabsorption by the tubules still undergoing regeneration. As in saline loading, the tubular fluid flow rate in the mentioned circumstances increases all along the nephron whereas, in the hereditary hypothalamic diabetes insipidus in which the influence of concentrating mechanism upon acute renal failure was tested[19] the increase in tubular flow rate was limited to the distal nephron. The pathophysiologic mechanisms responsible for the partial protection described are only a matter of speculations. It has been shown in our laboratory that a reduction of GFR was the major factor leading to the anuria in the methemoglobin induced ARF[15]. Intratubular obstruction, however, could have been responsible for the maintenance of ARF in some stages of its development. As a matter of fact, a rise in the proximal intratubular pressure was demonstrated on the 4th day after methemoglobin injection[15] and a significant improvement of inulin clearance coincided with a decrease towards normal of the proximal intratubular pressure in the second week after a single episode of ARF[4]. For these reasons, a decrease of intratubular obstruction caused by an increased in solute diuresis could have contributed to limit the severity of the disease in the second episode of our experiments.

In summary, our findings show that a first episode of ARF affords a partial resistance to a second one and suggest that solute excretion before the second episode instead of the degree of UK activity is the major determinant for that protection.

Summary

The present study was carried out to investigate if methemoglobin-induced acute renal failure (ARF) is followed by a resistance to a new ARF episode and to test a hypothesis that proposes a protective role of urinary kallikrein (UK) in such circumstances. Forty five female Wistar rats were challenged with methemoglobin + dehydration or saline + dehydration in two opportunities separated by a ten day interval. 24 hour urine previous to both episodes were collected to measure urine flow rate and UK, electrolyte, urea and osmolal excretion. Plasma urea (P_u) was determined in blood specimens taken before and 48 h after each episode. The magnitude of changes in urea excretion by the increment in urine flow rate was also studied in an additional group of five normal rats after water loading. A significant decrease in mortality from 33.3 to 8.3 % was found between the first and second episodes. Also, a moderate course of the disease was observed in the second episode, being the P_u measured 48 h after the disease was induced, one half of that recorded 48 h after the initial attempt, 1.57 ± 1.28 and 3.39 ± 1.56 g/l respectively, $p < 0.0005$. Plasma and urinary data obtained previous to the second ARF episode showed that at this time renal functional recovery from the first episode was incomplete. A slight increase in plasma urea ($p < 0.025$), a higher urine flow rate ($p < 0.0005$) and osmolal excretion ($p < 0.0005$) together with a lower ability to concentrate the urine ($p < 0.025$) was observed. With the increase in urine flow rate, urea excretion augmented significantly ($p < 0.01$) while urea clearance (C_u) remained without changes. Kallikrein excretion was not higher when expressed in μM/24 h 100 g and it was even diminished when factored by C_u ($p < 0.0025$) in the episode previous to the second ARF. The severity of the disease in the second ARF estimated by the 48 h P_u, was inversely correlated with urine flow rate and sodium and osmolal excretion previous, to the episode ($f = 0.60$, $p < 0.0025$; $r = 0.55$, $p < 0.0005$ and $r = 0.47$, $p < 0.0025$ respectively). This significant correlation was not found studying the same parameters in the first ARF episode. Saline injection administered to the control rats instead of methemoglobin showed no effect upon renal function in the first or second attempt. Our findings show that a first episode of ARF affords a partial resistance to a second one and suggest that solute excretion before the second episode instead of the degree of UK activity is the major determinant for that protection.

Resumen

RESISTENCIA PARCIAL A LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA POR METAHEMOGLOBINA EN RATAS EN RECUPERACIÓN DE UN FALLO RENAL PREVIO. PAPEL DE LA KALIKREÍNA URINARIA.

En el presente trabajo se investigó la posibilidad de que un episodio previo de insuficiencia renal aguda (ARF) provocado por metahemoglobina confiriera resistencia a un nuevo intento de inducción de la enfermedad. Asimismo se evaluó el rol que pudiera corresponderle en dicha protección al sistema kalikreína kinina renal determinando la excreción de kalikreína urinaria (UK). Se estudiaron 45 ratas hembras de la cepa Wistar que previa deshidratación fueron inyectadas con metahemoglobina o solución salina en dos oportunidades, separadas entre sí por diez días de intervalo. Se recogieron muestras de orina durante las 24 h previas a cada inyección para determinar flujo urinario y excreción de UK, electrolitos, urea y solutos. Asimismo, antes y 48 h después de cada inyección se tomaron muestras de sangre donde se midió la urea plasmática (P_u). También se estudió un grupo de ratas (5) que recibieron una sobrecarga oral de agua para evaluar la magnitud de los cambios de excreción de urea por el incremento del flujo urinario (Fig. 2). La mortalidad fue menor tras la segunda inyección de metahemoglobina, siendo los porcentajes de muerte consecutivos al primer y segundo episodio de 33.3 % y 8.3 %, respectivamente. El curso de la enfermedad del segundo episodio, estimado por la P_u de las 48 h postinyección fue más benigno observándose un valor de 1.57 ± 1.28 g/l, mientras que el correspondiente al primer episodio fue de 3.39 ± 1.56 ($p < 0.0005$, Fig. 1). En la Tabla 1 se puede

observar que al tiempo de inducir por segunda vez la IRA los animales se habían recuperado incompletamente del primer episodio. Así, pues, se encontró una urea ligeramente superior a la normal ($p < 0.025$) a la vez que un mayor flujo urinario, un aumento de la excreción de solutos y una menor capacidad de concentrar la orina respecto de los valores observados previamente al primer episodio ($p < 0.0005$, < 0.0005 y < 0.025, respectivamente). La excreción de urea aumentó también significativamente ($p < 0.01$), mientras que su clearance no mostró cambios. La excreción de UK expresada en $\mu M/24$ h/100 g, sin embargo, no aumentó significativamente en la etapa previa al segundo episodio y al referirla al C_u, fue aún significativamente menor ($p < 0.0025$, Fig. 3). La severidad de la enfermedad del segundo episodio estimada por la P_u de 48 h se correlacionó inversamente con el flujo urinario y la excreción de sodio y solutos previa al segundo episodio ($r = 0.60$, $p < 0.0025$; $r = 0.55$, $p < 0.0005$ y $r = 0.47$, $p < 0.0025$, respectivamente, Fig. 4). No se encontró correlación alguna al estudiar los mismos parámetros en el primer episodio. La inyección salina que fue utilizada como control, no provocó cambios sobre la función renal en ninguno de los dos episodios (Tabla 2). Nuestros resultados muestran que un primer episodio de ARF brinda una protección parcial contra un nuevo episodio y que ésta parecería resultar del aumento de la excreción de solutos y no de una mayor actividad de la UK.

Ackwowledgments: The authors acknowledge the skillful technical assistance of S. Brocca de Grimoldi. This work is supported by a grant from CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Buenos Aires, Argentina).

References

1. Arrizurieta de Muchnik E: Fisiopatología de la insuficiencia renal aguda. *Medicina intensiva* 3: 2, 47, 1978.
2. Bidani AK, Fleischmann LE, Churchill P, Becker-McKenna B: Natriuresis induced protection in acute myohemoglobinuric renal failure without renal cortical renin content depletion in the rat. *Nephron* 22: 529, 1978.
3. Carvalho JS, Landwehr DM, Oken DE: Renin release and the refractoriness to acute renal failure of rats recovering from prior renal failure. *Nephron* 22: 107, 1978.
4. Finn WF, Chevalier RL: Recovery from postischemic acute renal failure in the rat. *Kidney Int* 16: 113, 1979.
5. Hayes JM, Boonshaft B, Maher JF, O'Connell JMB, Schreiner GE: Resistance to glycerol induced hemoglobinuric acute renal failure. *Nephron* 7: 155, 1970.
6. Martín R, Nesse A, Arrizurieta de Muchnik EE. Urinary Kallikrein and pathophysiology of acute renal failure in the rat. *Medicina (Bs Aires)* 36: 223, 1976.
7. Martín R, Nesse A, Arrizurieta de Muchnik EE: Urinary Kallikrein excretion, renal kallikrein content and renal plasma flow in the rat. *Medicina (Bs Aires)* 39: 467, 1979.
8. Mc Donald FD, Thiel G, Wilson DR, DiBona GF, Oken DE: The prevention of acute renal failure in the rat by long-term saline loading: A possible role of the renin-angiotensin axis. *Proc Soc Exp Biol Med* 131: 610, 1969.
9. Nustad K: Relationship between kidney and urinary kininogenase. *Brit J Pharmc* 39: 73, 1970.
10. Nustad K, Pierce JV: Purification of rat urinary kallikreins and their specific antibody. *Biochem* 13: 2312, 1974.
11. Oken DE, Mende CW, Taraba I, Flamenbaum W: Resistance to acute renal failure afforded by prior renal failure: Examination of the role of renal renin content. *Nephron* 15: 131, 1975.
12. Parry WL, Schaefer JA, Muller CB: Experimental studies of acute renal failure. I. The protective effect of mannitol. *J Urol* 89: 1, 1963.
13. Paz RA, Nahmod VE: Insuficiencia renal aguda experimental con medida directa del flujo sanguíneo renal. *Medicina (Bs Aires)* 24: 1, 9, 1964.
14. Pérez-García R, López-Novoa JM, Casado S, Hernando L: Partial protection against acute renal failure in rats with reduced renal mass. *Proc of the Europ Dialysis and Transplant Assoc* 15: 402, 1978.
15. Ruíz-Guiñazú A, Coelho JB, Paz RA: Methemoglobin-induced acute renal failure in the rat. *Nephron* 4: 257, 1967.
16. Siegel NJ, Gunstraem SK, Handler RI, Kashgarian M: Renal function and cortical blood flow during the recovery phase of acute renal failure. *Kidney Int* 12: 199, 1977.
17. Snedecor GW: Statiscal Methods, Iowa State University, University Press, Ames, Iowa, 1956.
18. Thiel G, Brunner F, Wunderlich P, Huguenin M, Bienko B, Torhorst J, Peters-Haefeli L, Kirchertz EJ, Peters G: Protection of rat kidneys against $HgCl_2$ induced acute renal failure by induction of high urine flow without renin suppression. *Kidney Int* 10 S191, 1976.
19. Wilson DR, Thiel G, Arce ML, Oken DE: The role of the concentration mechanism in the development of acute renal failure: micropuncture studies using diabetes insipidus rats. *Nephron* 6: 128, 1969.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 60-64 (1981)

IONIC CHANGES FOLLOWING DENERVATION AND REINNERVATION IN MAMMALIAN SKELETAL MUSCLE

ELVIRA ARRIZURIETA DE MUCHNIK *, M. SOSA **, B. A. KOTSIAS, S. MUCHNIK

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

It has been demonstrated that some of the properties of normal skeletal muscle depend on neural control; they are modified after denervation and normalized after reinnervation. Membrane potential depolarization following denervation may result from factors such as changes in intracellular ionic concentrations. There is not much information on the influence of nervous system on the ionic and water content of muscle fibers although data was obtained from cross innervation experiments [5]. In the present work, sodium, potassium and water contents of control muscles and muscles at different times after denervation were measured. Functional reinnervation was also monitored using electrophysiological techniques. We have investigated the effect of these procedures on the water and electrolyte content of rat skeletal muscle.

Material and methods

A unilateral denervation of the extensor digitorum longus muscle (EDL) of 45 Wistar rats weighing 184.24 ± 47.7 g was performed under ether anesthesia by crushing the right deep peroneous nerve at 5 mm of the peroneous head. At 2, 3, 7, 11, 18, 23 and 30 days after denervation, the ionic and water composition of the right EDL as well as the left nondenervated EDL muscle (control), were studied, as previously reported [10]. Paired Student's "t" test was used for analysis of significance between denervated and contralateral control EDL muscles of the different groups, at a given time after denervation. Unpaired Student's "t" test was used when the groups studied at different times after denervation were compared between each other. In this situation, the control muscles were pooled and the denervated ones of each group were averaged after appropiate corrections were made.

In order to establish the day when the onset of functional contacts took place, the presence of mechanical response to indirect stimulation of the muscle and in vivo intracellular recording of end-plate potentials or muscle action potentials, were assessed at different times after denervation. Intracellular recordings were made by means of glass microelectrodes filled with 3 M KCl (8-20 MΩ), connected to a 564 B Textronix oscilloscope through a Bioelectric Instrument NFl Amplifier. A Grass camera was used to take pictures directly from the oscilloscope. Stimulation for the recording of the end-plate potentials and muscle action potentials was carried out by means of a plastic cuff containing a pair of platinum electrodes in close contact with the sciatic nerve. To avoid mechanical responses of other muscles, except those to be studied, their nerve branches were crushed. In some experiments where resting membrane potentials (RMP) were recorded in vitro, the EDL was removed and placed in a muscle bath; nondenervated EDL was used as control. The bathing fluid had the following composition in mM/l: NaCl: 135, KCl: 5, $CaCl_2$: 2, $MgCl_2$: 1, NaH_2PO_4: 1, $NaHCO_3$: 11, glucose: 10. Bubbling of solution was carried out with a gas mixture of 95 % oxygen and 5 % carbon dioxide, to bring the pH to 7.2-7.4 at 20-23° C.

— — — —

Received: 27-VIII-1980. Accepted: 17-IX-1980.

* Member of Research Career, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Research Fellow of Fundación Bolsa de Comercio, Buenos Aires.

Postal address: Instituto de Investigaciones Médicas, Donato Alvarez 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina.

Results

Two days after nerve crushing, denervated muscle wet weight remained unchanged or increased slightly, 8-15 % with respect to the contralateral non-denervated control muscle. The small increment in muscle wet weight was mainly due to a gain in water content (see below) since solid content estimated by dry muscle weight did not change significantly (Fig. 1). After the second day of denervation and until day 18, the muscle progressively lost up to 30 % of its weight. Four weeks after denervation the muscle weight returned to or near the control value. A 10 % decrease was, however, still present at that time. Total water content increased slightly, around 2-3 %, but significantly with respect to a control value of 74.34 ± 2.3 μl/100 mg wet weight after the second day postdenervation. This small increment in total water content diminished from day 11 until day 30 postdenervation. Two days after denervation the extracellular water content showed an increase of 30 % over a control value of 16.29 ± 3.9 μl/100 mg wet weight. This large increment in extracellular water was accompanied by a decrease in intracellular water content of the order of 5 to 8 %. A 15-20 % reduction in total potassium content (normal: 11.14 ± 0.85 μEq/100 mg wet weight) was observed after the seventh day postdenervation. Such a reduction represents a decrease of 12 %. $(K)_i$ begins to fall at the second day postdenervation, as shown in Table 1. The diminution of total potassium content was mainly due to a reduction in intracellular K concentration. On the other hand, total sodium content increased significantly, and around 30 % with respect to a control of 3.5 μEq/100 mg wet weight after the seventh day. This rise in total sodium content was due to both a substantial increase in extracellular water and an increase in intracellular sodium concentration. $(Na)_i$ showed a 50 % significant increase at the seventh day postdenervation. Around the eleventh day postdenervation the intracellular concentration of sodium and potassium tended to recover towards control values. To avoid misinterpretations resulting from comparing rats with different body weights, a test of significance was performed: total and extracellular water content and total sodium and potassium content of the control EDL muscles of rats with body weights lower than 150 g, between 150-250 g and over 250 g were found not to differ significantly.

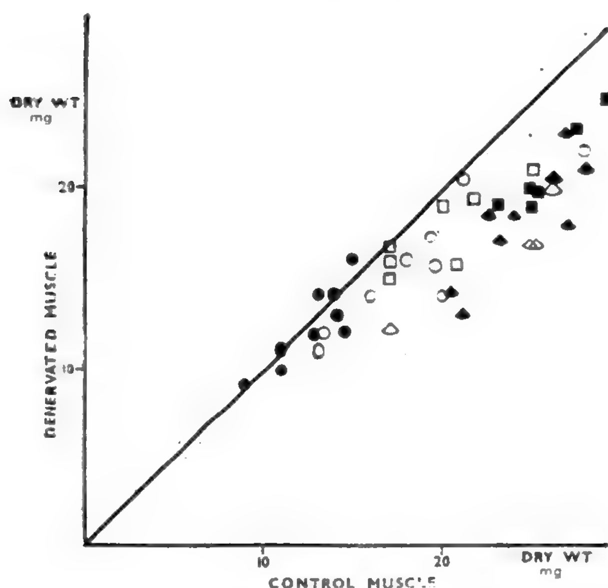


Fig. 1. — Interrelationship between dry weight of denervated and non-denervated control muscles at 2 (●), 7 (O), 11 (♠), 18 (△), 23 (■) and 30 (□) days. Identity line is indicated in solid tracing.

As can be seen in (Table 2) where electrophysiological and mechanical studies are shown, the first evidence of funtional reinnervation appeared on day 10. The resting membrane potential using the Goldman-Hodgkin-Katz equation assuming P : 0.013 (Na permeability relative to K permeability) is also shown in Table 1,

$$(Vm = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_k [K]_o + P_{Na} [Na]_o}{P_x [K]_i + P_{Na} [Na]_i})$$

TABLE 2

Days after nerve crush	Action potentials or EPPs intracellularly recorded *	Positive muscle mechanical response to nerve stimulation (%)
9	0	0
10	27.2 ± 8.0	60
11	70.8 ± 9.4	100

Means ± 1 SE.

* Percentage of fibers where. Action potential or EPPs were present.

TABLE 1. — *Hydroelectrolytic changes after denervation in the EDL rat muscle*

Groups	Total water content (μl/100 mg w.w.)	Extracellular water content (μl/100 mg w.w.)	Intracellular water content (μl/100 mg w.w.)	Sodium content (μEq/100 mg w.w.)	Potassium content (μEq/100 mg w.w.)	Intracellular Sodium (mEq/l)	Intracellular Potassium (mEq/l)	Calculated Em (mv)
C	74.34 ± 2.31 (45)	16.29 ± 3.86 (45)	58.05 ± 4.49 (45)	3.63 ± 0.92 (45)	11.14 ± 0.85 (45)	23.39 ± 11.35 (40)	191.49 ± 19.82 (44)	−81.21
2	76.22 ● ± 1.34 (9)	21.31 ● ± 3.51 (9)	54.91 ■ ± 2.98 (9)	3.85 NS ± 0.46 (8)	10.23 ● ± 0.58 (8)	22.51 NS ± 7.86 (8)	181.20 ▲ ± 9.09 (7)	−79.82
7	75.82 ● ± 0.96 (9)	21.39 ● ± 1.61 (9)	54.43 ● ± 2.19 (9)	4.38 ● ± 0.10 (5)	9.27 ● ± 0.62 (9)	35.54 ● ± 11.68 (9)	168.46 ● ± 10.77 (9)	−78.02
11	76.33 ● ± 1.07 (9)	22.66 ● ± 3.62 (9)	54.02 ● ± 3.70 (8)	4.52 ● ± 0.47 (7)	9.03 ● ± 0.74 (10)	32.37 NS ± 18.16 (8)	166.98 ● ± 21.22 (8)	−77.79
18	76.08 ● ± 0.77 (4)	25.09 ● ± 0.54 (9)	51.19 ● ± 1.74 (2)	5.43 ● ± 0.34 (4)	9.24 ● ± 0.34 (4)	32.06 ■ ± 6.36 (4)	183.2 ■ ± 2.55 (2)	−80.12
23	75.58 ● ± 0.76 (6)	22.57 ● ± 1.74 (6)	53.01 ● ± 1.92 (6)	3.99 NS ± 0.85 (5)	9.69 ● ± 0.61 (6)	29.06 NS ± 21.34 (5)	180.83 NS ± 13.8 (6)	−79.78
30	73.79 NS ± 1.48 (7)	19.49 ■ ± 2.83 (7)	54.86 ■ ± 2.95 (7)	4.44 ■ ± 0.75 (7)	10.16 ● ± 0.77 (7)	31.08 NS ± 13.42 (7)	183.61 NS ± 14.14 (7)	−80.17

Mean ± 1 SD and number of muscles, between brackets: ▲, ■ and ● indicate significant differences with respect to the control value at levels of $p < 0.05$, 0.02 and 0.01, respectively; C: control; 2, 7, 11, 18, 23 and 30 are days after denervation.

It is evident that the changes in ionic concentrations, although significant, can not account alone for the fall of the resting membrane potential experimentally obtained. The resting membrane potential fell significantly ($p < 0.001$) from -84.3 ± 0.5 mV (40 fibers) to -68.4 ± 0.5 mV (63 fibers) 72 hours after denervation. This difference increased with time after denervation. Thus 6.5 days after the crush, the values for control and denervated resting membrane potentials were -83 ± 0.3 (40 fibers) and -62.1 ± 1.2 mV (60 fibers), respectively ($p < 0.001$).

Discussion

The present results show that significant hydroelectrolytic changes take place in the skeletal muscle shortly after denervation. A slight but significant increase in total water content that lasted until day 11 was already observed 48 h postdenervation. This change in total water content disappeared between day 11 and 30. Together with the increment in total water content a shift from intracellular water towards the extracellular compartment, also occurred. Lost of intracellular water was an unexpected finding since a prompt increase in protein synthesis has been reported after denervation, that should induce in turn an osmotic intracellular water uptake [4, 8, 9, 11] if that new protein were in a soluble state. To balance the net intracellular protein gain, it may be postulated that other solutes such as potassium (and depending or the net protein charge) would have left the intracellular compartment in comparable amounts. The lack of solute gain by the denervated muscle (day 2) or even the lost of them (day 7-11) are shown in Figure 1 where dry muscle weight between denervated and control muscle were compared.

Contrarily to another report [12], our results show early changes after denervation, mainly in intracellular potassium concentrations. This change progressed until day 7 where an intracellular sodium change was also observed. After day 11, about the time the first functional contact was detected both potassium and sodium intracellular concentrations tended to recover. This sequency of events clearly indicates a neurogenic control of muscle ionic concentration. Similar results concerning intracellular potassium concentrations were reported by other authors in autoinnervation experiments [5]. Depolarization of skeletal muscle fibers is probably the earliest postdenervation change [1], and its origin is not fully understood at present. The changes in $(Na)_i$ and $(K)_i$, by themselves cannot account for the depolarization.

It has been suggested that the nervous system may exert its influence upon the muscle through both the effector activity elicited by nerve and / or by neurotrophic secretions [3, 5, 6, 9]. If neurotrophic factors were essential, it should be expected that potassium and sodium recovery would be present previously to a functional contact reinnervation. The small magnitude of ionic concentration changes in the transition period after denervation (between 7th and 11th day) do not allow us to establish whether their normalization takes place before or after the appearance of the first end-plate potentials.

Summary

Changes in the ionic and water content of EDL muscle following denervation were studied in Wistar rats. Unilateral EDL chronic denervation was performed by peroneous nerve crushing and muscle hydroelectrolytic composition studies were carried out at different times after denervation including the reinnervation phase. To precisely detect early functional reinnervation, end-plate and action potentials were registered. Shortly after denervation (48 h) a small but significant increase in total muscle water content and a slight significant diminution in intracellular potassium concentration were observed. While the total water muscle content increase remained unaltered throughout the first week postdenervation, the intracellular potassium concentration decreased continuously during that period. By this time intracellular sodium concentration increased significantly. Around day 10, when functional reinnervation was first detected, the above mentioned changes tended to return

to control values. These results suggest a neurogenic dependency of muscle hydro-electrolytic composition; they do not allow, however, to determine whether the recovery of the observed changes during re-innervation takes place before or after the beginning of nerve muscle functional contact.

Resumen

MODIFICACIONES DEL CONTENIDO DE AGUA, SODIO Y POTASIO CONSECUTIVOS A LA DENERVACIÓN Y REINERVACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

En ratas Wistar se estudiaron las modificaciones en las concentraciones de sodio y potasio, y el contenido y distribución del agua del músculo EDL consecutivos a la denervación. Esta fue realizada por aplastamiento unilateral del nervio peroneo profundo. Los estudios de composición hidroelectrolítica del músculo denervado y del contralateral usado como control, fueron hechos a distintos tiempos desde el aplastamiento del nervio (entre los días 2 y 30). Este período incluyó, también, la etapa de reinervación, cuya instalación fue detectada desde los momentos más precoces por la presencia de potenciales de placa y de acción. A las 48 h de la denervación, se encontró un leve pero significativo aumento del contenido de agua del músculo denervado, así como una disminución significativa, aunque de poca magnitud, de la concentración intracelular de potasio. Esta progresó en su descenso hacia el día 7 postdenervación, en tanto que el ligero aumento del agua total persistía. Asimismo, se encontró en ese momento un aumento significativo de la concentración de sodio intracelular. A partir del día décimo se observó que todos los cambios postdenervatorios tendían a normalizarse, no alcanzándose a detectar con precisión, sin embargo, si la normalización hidroelectrolítica precedía o no al restablecimiento de los contactos funcionales neuromusculares. Los resultados obtenidos muestran una dependencia neurógena de la composición hidroelectrolítica del músculo esquelético.

Acknowledgments: This wook was supported by a grant from the Cherny Foundation. The authors acknowledge the skilful assistance of Mrs Patricia Moliné de Lospinato, Adriana Losavio and Susana Brocca de Grimoldi.

References

1. Albuquerque EX, Schuh FT, Kauffman FC: Early membrane depolarization of the fast mammalian muscle after denervation. *Pflügers Arch* 328: 36, 1971.
2. Beresford BJ, Rathbone MP, Logan DM: Evidence for a selective stimulation of myosin synthesis following muscle denervation. *Exp Neurol* 52: 177, 1976.
3. Gutmamm E: Problems in differentiating trophic relationships between nerve and muscle cells. *In:* Motor innervation of muscle, S Thesleff (ed), Academic Press, New York, 1976, p 323.
4. Held IR: Stimulation of nuclear RNA synthesis in denervated skeletal muscle. *J Neurochem* 30: 1239, 1978.
5. Hoh JF, Salafsky B: Effects of nerve cross union on rat intracellular potassium in fast-twitch rat muscles. *J Physiol* 216: 171, 1971.
6. Lömo T: The role of activity in the control of membrane and contractile properties of skeletal muscle. From motor innervation of muscle, S Thesleff (ed), Academic Press, New York, 1976, p 289.
7. Lömo T, Rosenthal J: Control of Ach sensitivity by muscle activity in the rat. *J Physiol* 221: 493, 1972.
8. Manchester JK, Harris EJ: Effect of denervation on the synthesis of Ribonucleic acid and Deoxyribonucleic acid in rat diaphragm muscle. *Biochem J* 108: 177, 1968.
9. Muchnik S, Kotsias BA: Effect of chronic stimulation of denervated muscle on the uridine-5-^{3}H incorporation and fibrillation activity. *Life Sci* 16: 543, 1975.
10. Muchnik S, Kotsias BA, Arrizurieta de Muchnik EE: In vivo and in vitro miniature endplate potentials at various external K concentrations. *Am J Physiol* 229: 1733, 1975.
11. Politoff AL, Blitz AL: Neurotrophic control of RNA synthesis in amphibian striated muscle. *Brain Research* 151: 561, 1971.
12. Robbins N: Cation movements in normal and short-term denervated rat fast twitch muscle. *J Physiol* 271: 605, 1977.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 65-70 (1981)

TRATAMIENTO DEL CANCER AVANZADO DE MAMA CON CICLOFOSFAMIDA, METOTREXATE, 5 - FLUOROURACILO Y PREDNISONA (CMFP)

M. G. RABINOVICH, B. A. LEONE, OLGA LANDO

Hospital Regional Neuquén, Provincia de Neuquén

El cáncer de mama se ha transformado, al igual que ha ocurrido con las leucemias, linfomas y cáncer de testículo, en uno de los objetivos principales de la quimioterapia. La tasa de respuesta en el carcinoma de mama avanzado con monoquimioterapia oscila entre el 30 al 40 % [2]. Combinaciones de varias drogas activas, generalmente presentan mayores tasas de respuestas y remisiones más duraderas con respecto a la monoquimioterapia [1, 4, 9, 13]; es por eso que a partir de abril de 1978 iniciamos un protocolo de tratamiento para cáncer avanzado de mama consistente en la combinación de Ciclofosfamida, Metotrexate, 5-Fluorouracilo y Prednisona, drogas probadamente eficaces como agentes individuales en dicha neoplasia [7, 8]. Canellos [5] ha conseguido un 64 % de respuestas totales (parcial y completa) con este esquema. Greenspan inicia el tratamiento con combinación de drogas obteniendo un 81 % de respuesta en una serie de 73 pacientes, con una duración media de siete meses, utilizando Metotrexate, Ciclofosfamida, 5-Fluorouracilo, Prednisona, Testosterona y Thio-Tepa [11]. Cooper en 1969 presenta un esquema CM FVP (Ciclofosfamida, Metotrexate, 5-Fluorouracilo, Vincristina y Prednisona) con una respuesta global del 88 %. Posteriormente se han publicado numerosos trabajos de diversos autores con regímenes similares, con los resultados que se aprecian en la Tabla 1. La elección de este esquema terapéutico se fundamentó en el uso de agentes individualmente eficaces, con muy poca toxicidad aditiva, de diferente mecanismo de acción, fácil administración, de relativo bajo costo en relación a otros esquemas quimioterápicos y sin dificultades de obtención.

Recibido: 13-V-1980. Aceptado: 22-IX-1980.

Dirección postal: Hospital Regional Neuquén, 8300 Neuquén, Argentina.

Material y métodos

Desde abril de 1978 a junio de 1979 ingresaron a nuestro protocolo veintiocho pacientes con carcinoma avanzado de mama. De éstas fueron evaluables veintiuno, las siete restantes fueron excluidas por abandono voluntario: tres pacientes; dos por cambio en la zona de radicación; una por fallecimiento antes de finalizar el primer curso de tratamiento y una por falta de continuidad en el tratamiento.

Criterios de selección: a) evidencia histológica de cáncer de mama; *b)* evidencia objetiva de enfermedad diseminada (metástasis a distancia); *c)* el volumen de la afección clínica fue evaluado por medición directa y/o radiográfica.

Criterios de exclusións a) metástasis en sistema nervioso central; *b)* tratamiento antitumoral previo; *c)* tratamientos hormonales aditivos o supresivos de menos de un mes de efectuados.

Estudios básicos: Historia clínica, performance-status, estudios radiológicos de esqueleto y tórax cada dos meses, mamografía cada seis meses, centellografías ósea, hepática y cerebral cada tres

TABLA 1. — *Estudios con combinaciones de 2 a 5 fármacos*

Autor	Tratamiento	Número de pacientes	CR + PR * %	Duración mediana (meses)	Supervivencia mediana (meses)
Cooper (1969)	CMFVP	60	88	10	NR **
De Lena (1973)	CMFV	55	46	4	13
Spigel (1973)	CMFV	16	62	8	NR
Blumenschein (1974)	FAC	25	72	NR	NR
Jones (1975)	CA	50	80	10	17
De Jager (1975)	CAF	44	50	3	NR
Pouillart (1975)	VCF	27	77	NR	8
Canellos (1976)	CMF	40	68	8	18

* CR: Respuesta completa; PR: Respuesta parcial. ** No reportada.

meses; estudios de laboratorio que incluyeron: hemograma, eritrosedimentación y recuento de plaquetas mensualmente, hepatograma, proteinograma, calcemia, LDH, 5-nucleotidasa y función renal bimestralmente. Todas las pacientes fueron sometidas a punción de médula ósea previa al tratamiento.

Categoría de la respuesta.

1. *Regresión objetiva: a)* respuesta completa: desaparición de toda enfermedad conocida. En el caso de metástasis óseas líticas, éstas deben mostrar estar calcificadas radiológicamente; *b)* respuesta parcial: más del 50 % de disminución de las lesiones medibles No hay nuevas lesiones. No es necesario, para cada lesión, tener regresión para calificar una respuesta parcial, pero no debe haber progresado la lesión.

2. *Ningún cambio:* lesiones sin cambio (ejemplo: disminución de menos del 50 % o aumento de menos del 25 % en el tamaño de las lesiones medibles).

3. *Enfermedad progresiva: a)* mezclada: el retroceso de algunas lesiones mientras otras progresan o aparecen nuevas lesiones; *b)* fracaso: progreso de alguna o todas las lesiones y/o aparición de nuevas lesiones. No hay lesiones regresivas.

Duración de la respuesta: En aquellas pacientes con regresión objetiva se consideró al tiempo desde el comienzo de la terapia hasta que aparecieron nuevas lesiones, o que alguna lesión ya existente aumentó en un 25 % o más de la medida más pequeña registrada, como duración de la respuesta.

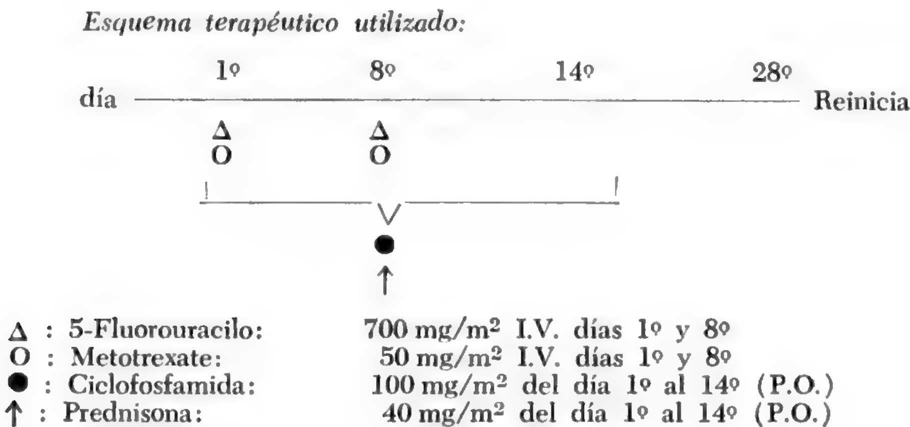
Sobrevida: Se consideró como tal al tiempo transcurrido desde el comienzo del tratamiento a la muerte.

Todas nuestras pacientes, incluidas aquellas cuya categoría de respuesta fue de "ningún cambio", efectuaron el tratamiento poliquimioterápico hasta la demostración de enfermedad progresiva en cuyo caso fueron incluidas en otro esquema terapéutico. En la Tabla 2 se puede apreciar la incidencia de localizaciones metastásicas que presentaron nuestras pacientes al ingreso en el protocolo.

TABLA 2.— *Incidencia de localización metastásica* *

Localización	Número de pacientes	%
Oseas	16	57.14
Ganglionares	15	53.57
Dérmicas	9	32.14
Pulmonares	6	21.42
Hepáticas	6	21.42
Serosas	4	14.28

* En 28 pacientes.



Resultados

De 21 pacientes tratadas con el esquema CMFP se obtuvo una regresión objetiva de la enfermedad metastásica del 61.9 % (Tabla 3). De esta última cifra, el 4.76 % corresponde a respuesta completa (1 paciente); el 57.14 % (12 pacientes) obtuvo una respuesta parçial. En 8 pacientes (38 %) no se obtuvo ningún cambio.

Tabla 3. — *Respuestas obtenidas con CMFP*

Tipo de respuesta	Número de pacientes	Respuesta %
Respuesta completa (R.C.)	1	4.76
Respuesta parcial (R.C.)	12	57.14
Ningún cambio (N.C.)	8	38.00
Regresión objetiva (R.O.) (R.C. + R.P.)	13	61.9

Hemos comprobado que de las 13 pacientes que obtuvieron una regresión objetiva una (7.7 %) la obtuvo al primer curso, cuatro (30.8 %) al segundo curso, seis (46.1 %) al tercer curso y dos (15.4 %) al cuarto curso. Observando la Tabla 4 se aprecia que el 100 % de las pacientes respondedoras lo hace dentro de los primeros cuatro cursos de tratamiento.

El tiempo medio de la duración de la respuesta fue de 11.4 meses con un rango entre 8 a 21 meses. Analizando la Tabla 5 vemos que con 12 meses de duración de

Tabla 4. — *Inicio de las regresiones objetivas con CMFP*

Inicio de respuesta	Número de casos	%
1º curso	1	7.7
2º curso	4	30.8
3º curso	6	46.1
4º curso	2	15.4
Total de pacientes	13	100

la regresión objetiva se encuentra el 53.8 % de nuestras pacientes. En cambio al 13º mes sólo el 23.1 % permanece en regresión.

Con respecto a las respuestas en relación a la edad, se observa que el mayor número de las mismas se obtiene entre 45-55 años, período de mayor incidencia de la enfermedad en esta población de pacientes (Tabla 6).

En lo que a sobrevida se refiere, tomamos como fecha evaluativa diciembre de 1979. A pesar de que es aún prematuro determinar la diferencia entre respondedoras y no respondedoras, podemos comentar algunos datos preliminares. De los 13 pacientes que respondieron, 11 están vivas (84.61 %) y 2 fallecieron a los 15 y 20 meses, respectivamente, de iniciado el tratamiento. De éstas (11.7 %) han sobrepasado los 15 meses de sobrevida. De las 8 pacientes no respondedoras, 4 viven (50 %) y 4 fallecieron a los 8, 9, 12 y 14 meses de tratamiento.

Tabla 5. — *Duración de las regresiones objetivas con CMFP*

Duración (en meses)	Nº de pacientes		Nº de pacientes acumulados		Antiacumulada porcentual *
	Nº	%	Nº	%	
8	1	7.7	1	7.7	92.3
9	1	7.7	2	15.4	84.6
10	2	15.4	4	30.8	69.2
11	1	7.7	5	38.5	61.5
12	1	7.7	6	46.2	53.8
13	4	30.7	10	76.9	23.1
15	1	7.7	11	84.6	15.4
17	1	7.7	12	92.3	7.7
21	1	7.7	13	100	0
Total	13	100	—	—	—

* Porcentaje de pacientes que están en regresión objetiva entre los meses 8 y 21.

TABLA 6. — *Pacientes con cáncer de mama, según edad y tipo de respuesta al tratamiento con CMFP*

Edad	Número de pacientes		Regresión objetiva		Ningún cambio	
	Nº	%	Nº	% *	Nº	% *
30 - 34 años	1	4.8	—	—	1	4.8
40 - 44 años	1	4.8	—	—	1	4.8
45 - 49 años	6	28.6	5	23.8	1	4.8
50 - 54 años	6	28.6	3	14.3	3	14.3
55 - 59 años	1	4.8	1	4.8	—	—
60 - 64 años	2	9.5	1	4.8	1	4.8
65 - 69 años	2	9.5	1	4.8	1	4.8
70 - 74 años	—	—	—	—	—	—
75 - 79 años	2	9.5	2	9.5	—	—
Total	21	100	13	61.9	8	38.1

* Los porcentajes se calcularon sobre el total de pacientes (21).

Toxicidad: Aproximadamente un 66 % de los pacientes desarrollaron leucopenia en algún momento del estudio. Esta última fue leve (más de 3000 leucocitos/mm^3) en 8 pacientes; moderada (de 2000 a 3000 leucocitos/mm^3) en 4 pacientes y grave (menos de 2000 leucocitos/mm^3) en dos pacientes. En esta última forma se interrumpió el tratamiento hasta la normalización de la cifra. En los casos de leucopenia leve y moderada se reduujo la dosis de tratamiento de acuerdo a las tablas convencionales.

Plaquetopenia se produjo en 38 % de los pacientes, siendo menor de 50 000 por mm^3 en un solo caso, que obligó a suspender el tratamiento hasta la normalización.

Entre los síntomas digestivos, los más frecuentes fueron: náuseas, vómitos y diarrea en 13 de las 21 pacientes tratadas. Con menos frecuencia observamos estomatitis y rectitis.

Herpes zoster de moderada intensidad se vio en una sola paciente durante el 5º curso de tratamiento.

La alopecía estuvo presente en 5 de las 21 pacientes.

Discusión

Del estudio de los resultados obtenidos en nuestro trabajo (61.9 % de regresión objetiva) coincidiendo con Canellos [5] que informa un 64 %, se deduce que este esquema terapéutico (CMFP) muestra un porcentaje de respuesta que si bien no es tan alto como aquellos que contienen Adriamicina, presenta una duración de las respuestas superponible [3, 12-14]. Las metástasis que más respondieron fueron las linfonodales y las de partes blandas, en menor grado las óseas, pulmonares y hepáticas. De acuerdo a lo observado en la Tabla 4 se concluye que si una enferma no arriba a una regresión objetiva hasta el 4º curso de tratamiento las posibilidades de obtener una respuesta son escasas. Esto último se basa en que aquellas pacientes cuya categoría de respuesta fue "ningún cambio", y que de acuerdo a nuestro protocolo continuaron en tratamiento hasta progresión de enfermedad, en ningún caso obtuvieron regresión objetiva. Dentro de las ventajas de este tratamiento, figuran su baja morbilidad, escasa toxicidad aditiva, fácil administración y manejo clínico. Además, y de acuerdo a lo demostrado por Brambilla y col. [3] otra de las ventajas de este esquema terapéutico es la ausencia de resistencia cruzada con la Adriamicina y la Vincristina (A-V) que se podría utilizar como segundo tratamiento ante el fracaso del primer esquema. Pensamos que tal vez utilizando las mismas drogas con excepción de la Prednisona, pero modificando sus dosis, forma y secuencia de administración se podrían obtener mejores respuestas terapéuticas. Esto último, se basa en el posible antagonismo existente

entre el 5-Fluorouracilo y el Metotrexate [6, 10, 15]. A partir de enero de 1980, hemos comenzado con un nuevo protocolo para carcinoma avanzado de mama, en el cual no se aplican simultáneamente las dos drogas mencionadas anteriormente a fin de evaluar clínicamente los hallazgos mencionados.

Resumen

A partir del mes de abril de 1978 a junio de 1979 ingresaron a nuestro protocolo CMFP 28 pacientes de las cuales fueron evaluables 21, obteniéndose una regresión objetiva de 61.9 %. De ésta 4.76 % fue respuesta completa y 57.14 % respuesta parcial. En el 38 % de los casos no se obtuvo cambio alguno. El tiempo medio de respuesta fue de 11.4 meses. Todas las pacientes que obtuvieron una regresión objetiva lo hicieron dentro de los primeros cuatro cursos de tratamiento. Las metástasis que mejor respondieron fueron las linfonodales y las de partes blandas y en menor grado las óseas, pulmonares y hepáticas. La toxicidad presentada por este esquema terapéutico fue de escasa magnitud. A partir de enero de 1980 se inició un nuevo protocolo para carcinoma avanzado de mama en el cual no se aplican simultáneamente 5-Fluorouracilo y Metotrexate debido a su posible antagonismo farmacológico.

Summary

TREATMENT OF ADVANCED BREAST CANCER WITH CYCLOPHOSPHAMIDE, METHOTREXATE, 5-FLUOROURACIL AND PREDNISONE (CMFP).

The response rate in the treatment of advanced breast cancer with monochemotherapy fluctuates between 30 and 40 %. Combination of several active drugs in general offers a greater response rate and longer lasting remissions (Table 1). From April 1978 up to June 1979, 28 patients were listed in our CMFP protocol; the incidenle of metastatic infiltration can be seen in Table 2. Of these cases, 21 could be evaluated, obtaining a response in 61.90 %: with 4.76 % of complete response, 57.14 % of partial response and 38 % showing no alteration (Table 3). All the patients who went into regression did so within the first four courses of treatment (Table 4). The average time response was 11.4 months (Table 5). With regard to age, the larger number of patients were between 45 and 55 years old (Table 6). The best responses were seen with lymphonodal and soft tissue metastasis and in lesser degree with bone, lung and liver metastasis; toxicity level was very low. In January 1980 we started a new protocol for advanced breast carcinoma in which 5-Fluorouracil and Methotrexate will not be applied simultaneously, due to a possible pharmacological antagonism.

Agradecimientos: Agradecemos la colaboración de la Lic. Estela de Acosta, y de los doctores F. N. Cornejo, R. Raña y O. Pellin.

Bibliografía

1. Blumenschein GR, Cárdenas JO, Freireich EJ, Gottlieb JA: 5-Fluorouracil, Adriamycin and Cyclophosphamide chemotherapy for breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 15: 1931, 1974.
2. Brambilla C, De Lena M: *Risultati della polichemioterapia nel carcinoma mammario metastizzato. I Tumori della Mamella,* 1977, Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
3. Brambilla C, De Lena M, Rossi A, Velagussa P, Bonadonna G: Response and survival in advanced breast cancer after two non cross-resistant combinations. *Brit Med J* 1: 801, 1976.
4. Broder CE, Torney DL: Combination chemotherapy of carcinoma of the breast. *Cancer Treat Rev* 1: 183, 1974.
5. Canellos GP, De Vita VT, Gold GL, Chabner BA, Schein PS, Young RC: Cyclical combination chemotherapy in the treatment of advanced breast carcinoma. *Proc Am Ass Cancer Res* 15: 37, 1974.
6. Capizzi RL, Kaiser LW, Sartorelli AC: *Quimioterapia de combinación: teoría y práctica. Quimioterapia del cáncer, bases farmacológicas. Seminarios de Oncología.* Ed Med Panamericana, p 143, 1978.
7. Carter SK: Single and combination nonhormonal chemotherapy in breast cancer. *Cancer* 30: 1543, 1972.
8. Carter SK: The chemical therapy of breast cancer. *Semin Oncol* 1: 131, 1974.
9. De Lena M, De Palo G, Bonadonna G et al: Treatment of metastatic breast cancer with

Cyclophosphamide, Methotrexate, Vincristine and Fluorouracil. *Tumori* 50: 11, 1973.

10. Friedman MA, Sadés W: The fluoropyrimidines: biochemical mechanisms and design of clinical trials. *Cancer Chem and Pharm* 1: 77, 1978.

11. Greenspan EM: Combination cytotoxic chemotherapy in advanced disseminated breast carcinoma. *J Mount Sinai Hosp NY* 33: 1, 1966.

12. Guterman JV, Cárdenas JO, Blumenschein GR: Chemoimmunotherapy of advanced breast cancer. Prolongation of remission and survival with BCG. *Brit Med* J 1: 1222, 1976.

13. Jones SE, Durie BGM, Salmon SE: Combination chemotherapy with Adriamycin and Ciclophosphamide for advanced breast cancer. *Cancer* 36: 90, 1975.

14. Salmon SE, Jones SE: Studies of the combination of Adriamycin and Cyclophosphamide (alone or with other agents) for the treatment of breast cancer. *Oncology* 36: 40, 1979.

15. Tattersall MHN, Jackson RC, Connors TA et al: Combination chemotherapy: Interaction of methotrexate and 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 9: 733, 1973.

- - - -

Una de las responsabilidades más graves de la lentitud del progreso científico incumbe a la Universidad, hoy perturbada por desviaciones políticas. En ella dominó, hasta hace poco, la idea de que sólo debía formar profesionales a base de clases (recitaciones) y tomar exámenes, sin aceptarse la idea de que le incumbe organizar y dirigir la investigación y considerarla la base de su vida y evolución.

BERNARDO A. HOUSSAY (1887-1971)
Instituto Popular de Conferencias, 1929

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 71-74 (1981)

ENDOCARDITIS INFECCIOSA POR *PEPTOESTREPTOCOCCUS* LUEGO DE CATETERISMO CARDIACO

D. J. PIÑEIRO, M. VAZQUEZ BLANCO, AMALIA J. FERNANDEZ

Primera Cátedra de Medicina, Facultad de Medicina y Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Clásicamente se reconoce a bacterias anaeróbicas del género *Clostridia* como agentes etiológicos del tétanos, el botulismo y la gangrena gaseosa a través de la producción de toxinas [4]. En los últimos años ha aumentado el interés sobre el papel de otros gérmenes anaeróbicos en las infecciones humanas, ya sea como agentes etiológicos únicos o como componentes de infecciones mixtas [4]. Se ha establecido su importancia en infecciones abdominales, infecciones del tracto biliar, abscesos hepáticos, abscesos pelvianos, infecciones del tracto genital femenino, abortos sépticos, sepsis post-parto, supuraciones pleuropulmonares, abscesos cerebrales e infecciones de los tejidos blandos (fascitis necrotizante, miositis por estreptococos anaeróbicos, celulitis crepitante, gangrena bacteriana sinérgica progresiva, úlcera crónica perforante y celulitis necrotizante sinérgica) [3, 4, 6]. También se han aislado bacterias anaeróbicas como agentes de endocarditis [2-6, 9, 13]. Se presenta el caso de una paciente con una endocarditis producida por un germen anaeróbico: *Peptoestreptococcus sp*, cuya probable puerta de entrada fue un cateterismo cardíaco.

— — — —

Recibido: 16-VI-1980. Aceptado: 7-I-1981.

Dirección postal: Primera Cátedra de Medicina, Hospital de Clínicas José de San Martín, Córdoba 2351, 1120 Buenos Aires, Argentina.

CASO CLÍNICO

Paciente B. R. G., 22 años, sexo femenino, historia clínica del Hospital de Clínicas José de San Martín 75 263. Ingresó el 11-III-1976. Egresó el 9-V-1976. Desde su niñez presentaba crisis de cianosis con disnea, dolor precordial, síncopes e hipotensión, que mejoraban al agazaparse. Un año antes de su internación se le efectuó un fonocardiograma y se le indicó un estudio hemodinámico. El 15-II-1976 se realizó cateterismo cardíaco por vía arterial y venosa sin profilaxis antibiótica. Con la angiocardiografía se concluyó que se trataba de una tetralogía de Fallot. Desde entonces comenzó con astenia, anorexia, temperatura de hasta 39° C, escalofríos, sudoración y pérdida de 3 kg de peso en un mes.

Examen físico: Sin cianosis. Sin edemas. Sin adenomegalias. Sistema osteo-articulomuscular normal. Cabeza y cuello: normal. Aparato respiratorio: normal. Sistema cardiovascular: pulso radial regular, igual de amplitud y tensión disminuida. T. A. 120/80. Pulsos periféricos presentes, no diferentes, sin soplos. No se palpaba el choque de la punta, se palpaba un frémito sistólico en mesocardio. Se auscultaba 1er. ruido normal; 2do. ruido con componente aórtico intenso y pulmonar disminuido; soplo sistólico en margen izquierda de esternón. No se palpaba hígado, ni bazo. Ruidos hidroaéreos presentes. Puño percusión lumbar indolora. Sistema nervioso: normal.

Evolución: La paciente evolucionó con fiebre de hasta 39° C. Los exámenes complementarios mostraron: glóbulos rojos 4 750 000/mm^3; hemoglobina: 14.6 g %; hematocito: 44 %; eritrosedimentación: 17; glóbulos blancos: 8500. Neutrófilos: 80, eosinófilos: I, basófilos: 0; linfocitos: 16; monocitos: 3; glucemia: 80 mg %; uremia: 19 mg %; hepatograma: normal; proteinograma: normal. Factor reumatoideo: negativo;

células L. E.: negativas; complemento: normal. Proteína C reactiva: negativa. Antiestreptolisinas: 160 U. Un fonocardiograma confirmó los hallazgos auscultatorios.

Se tomaron 4 muestras de sangre venosa para hemocultivo. Se inició tratamiento con el diagnóstico presuntivo de endocarditis infecciosa con penicilina G Na 40 000 000 UI por día por vía intravenosa y estreptomicina 1 g por día por vía intramuscular. Desde el 5º día de tratamiento la paciente permaneció afebril. El 10º día de tratamiento se recibió el informe bacteriológico: *Peptostreptococcus sp* en 4 muestras de hemocultivo. Se continuó con penicilina G Na 40 000 000 UI por vía intravenosa durante 5 días y se completó el tratamiento con fenoximetil penicilina por vía oral durante 30 días. La paciente no presentó complicaciones, curó y fue controlada clínicamente y con hemocultivos durante 6 meses.

Bacteriología: Las cuatro muestras de sangre remitidas fueron sembradas en la proporción del 10 % en caldo tripticasa Soya y en caldo tioglicolato de sodio. Los cultivos se analizaron diariamente y a los 6 días de incubación se observó sólo desarrollo en los medios que permiten el crecimiento de bacterias anaerobias (caldo tioglicolato de sodio). Al examen microscópico con la coloración de Gram se observaron cocos gram positivos agrupados en largas cadenas que aislados en agar sangre e incubados en aerobiosis no mostraron desarrollo pero que desarrollaron en agar sangre incubado en jarra Gas-Pak. Los géneros *Peptostreptococcus* y *Peptococcus* pertenecen a la familia *Peptococcaceae.* La mayoría de las especies que integran ambos géneros poseen poca actividad bioquímica y para diferenciarlos se recurre fundamentalmente a la morfología y al test de la catalasa. En nuestro caso la bacteria fue catalasa negativa.

Discusión

El *Peptostreptococcus* es un coco gram positivo anaerobio, cuyo habitat es la cavidad oral, el tracto digestivo, la piel y el tracto genital femenino [10]. En el caso que se presenta no había antecedentes de foco séptico, ni instrumentación en cavidad oral, tracto digestivo, ni tracto genital. La relación temporal entre el cateterismo cardíaco y el comienzo del síndrome febril hace pensar que aquél fue la puerta de entrada el germen, hecho que no hemos encontrado descripto en la literatura [11]. Como otros autores [4, 13] no observamos diferencias en el cuadro clínico con respecto a endocarditis por otros estreptococos. La elección del tratamiento con penicilina se debió a la uniforme sensibilidad del *Peptoestreptococcus* a bajas concentraciones de este antibiótico [10]. La vía oral para el tratamiento de la endocarditis infecciosa ha sido motivo de controversias [13]. La intención al emplearla en este caso fue evitar la sobreinfección a partir de la canalización; considerando la susceptibilidad de una paciente con una Tetralogía de Fallot a la endocarditis infecciosa y la alta incidencia de desarrollo bacteriano en cultivos de punta de catéter en el Hospital de Clínicas "José de San Martín" que llegó en 1975 a 51.5 % [7]. Actualmente el Comité de Normatización de Infecciones del Hospital sólo recomienda la vía oral para el tratamiento de endocarditis por *Streptococcus viridans* muy sensibles a la penicilina (concentración inhibitoria mínima menor de 0.3 microgramos de penicilina G Na por ml) luego 2 semanas de penicilina G Na por vía intravenosa para completar 4 semanas de tratamiento con control de la actividad bactericida del suero.

Llama la atención la alta frecuencia con que se comunica en la literatura el aislamiento de gérmenes anaeróbicos. Entre 1971 y 1972 de 27 588 especímenes recibidos por el laboratorio de bacteriología de la Clínica Mayo, 10 988 (27 %) desarrollaron gérmenes anaeróbicos, lo que representa el 39 % de los especímenes con cultivos positivos para cualquier bacteria [8]. En los hemocultivos las publicaciones mencionan hasta 12 % de desarrollo de anaeróbicos [11], alcanzando a más de 20 % las bacteriemias por *Peptoestreptococcus* luego de cirugía de la cavidad oral [1]. De un grupo de 1498 endocarditis infecciosas de la literatura 55 (3.8 %) se debían a bacterias anaeróbicas, 53 (96 %) de las cuales eran *Peptoestreptococcus* y estreptococos microaerofílicos [2, 4, 13]. Estos datos contrastan con la rareza con que bacterias anaeróbicas son aisladas en nuestro medio. La diferencia probablemente radica en la metodología comúnmente empleada en la recolección, manipuleo y cultivo de las muestras que resulta inadecuada para el desarrollo de bacterias anaeróbicas. Esta sería una de las causas de endocarditis infecciosa con hemocultivos negativos [5], que se caracteriza por la mayor incidencia de complicaciones [5] y mortalidad y por las dificultades en su tratamiento [13]. El em-

pleo generalizado de penicilina en los esquemas de tratamiento de la endocarditis infecciosa con hemocultivos negativos [5, 13] cubre la mayoría de los gérmenes anaeróbicos, incluso con ventajas respecto a la sensibilidad y efectos secundarios sobre otros antimicrobianos como la lincomicina, clindamicina y cloranfenicol [4, 14]. Sin embargo el *Bacteroides fragilis* constituye una importante excepción ya que es resistente a la penicilina y sensible al cloranfenicol, clindamicina y metroimidazol [4, 6, 14].

Resumen

Se presenta el caso de una paciente de 22 años, con una Tetralogía de Fallot que luego de un cateterismo cardíaco padeció una endocarditis infecciosa por un germen anaeróbico: Peptostreptococcus sp. *Se trató exitosamente con penicilina por vía intravenosa durante dos semanas y por vía oral durante las siguientes dos semanas. Se señala que la presentación de endocarditis infecciosa por* Peptoestreptococcus *con puerta de entrada por cateterismo cardíaco no está referida en la literatura. Se discute el tratamiento por vía oral. Se llama la atención sobre la alta frecuencia con que en la literatura se comunica el aislamiento de gérmenes anaeróbicos en contraste con su rareza en nuestro medio, lo que se atribuye a la metodología en la recolección, manipuleo y cultivo de las muestras.*

Summary

Peptoestreptoccocus ENDOCARDITIS AFTER CARDIAC CATHETERIZATION.

Interest in anaerobic, non-sporulated microorganisms in several human infections has increased in the last years. Anaerobic bacteria have also been isolated in endocarditis. A case of a 22 year old female with Tetralogy of Fallot and a Peptostreptococcus *endocarditis is reported. The patient presented fever after a cardiac catheterization by venous and arterial routes. As no other infectious focus could be found, infective endocarditis was diagnosed. She was treated with penicillin, G 40 000 000 units daily, through intravenous catheter and streptomycin, 1 g daily by intramuscular injection, during 10 days. Blood cultures revealed* Peptostreptococcus sp. *on day 10. Streptomycin was discontinued and penicillin alone was given intravenously for the next 5 days. Therapy was completed with oral phenoxy-methyl-penicillin for a fortnight. Treatment was discontinued on day 30. The patient remained well for the next six months and blood cultures did not demonstrate any bacterial growth.* Peptostreptococcus *is a gram-positive, anaerobic coccus. It is an habitual inhabitant of the mouth. intestinal tract, vagina and skin. Onset of the infection in our patient was not related with mouth, intestinal or genital instrumentation, but it followed cardiac catheterization. This source of* Peptostreptococcus *endocarditis has not been described previously in the literature. Clinical manifestations were not different from those of endocarditis caused by other* Streptococci.

Selection of penicillin G for treatment depended on the high sensitivity of Peptostreptococci *to penicillin. It was given parenterally for the first 2 weeks and orally during the following 15 days. This was determined by the possibility of over-infection in this patient with a congenital heart disease and prolonged antibiotic therapy through intravenous catheter. The rate of culture isolation of microorganisms from catheters was 51.5 % in our hospital in 1975. The fact should be noted that, in contrast with the international experience, cases of anaerobic microorganisms are seldom found in our country. This is attributed to differences in methodology of collection, handling and culture of samples. This could be one of the causes of failure to demonstrate bacteremia by common blood cultures in some cases of endocarditis.*

Bibliografía

1. de Vries J, Francis LE, Lang D: Control of post-extraction bacteraemias in the penicillin-hypersensitive patient. *J Can Dent Assoc* 38: 63, 1972.
2. Felner JM, Dowell VR: Anaerobic bacterial endocarditis. *New Engl J Med* 283: 118, 1970.

3. Finegold SM (moderator): Management of anaerobic infections (UCLA Conference). *Ann Intern Med* 83: 375, 1975.
4. Gorbach SL, Bartlett JG: Anaerobic Infections. *New Engl J Med* 290: 117, 1237, 1289, 1974.
5. Lerner Ph I: Infective endocarditis. A review of selected topics. *Med Clin N Am* 58: 605, 1974.
6. Levison ME: The importance of anaerobic bacteria in infectious diseases. *Med Clin NA* 57: 1015, 1973.
7. Marcenac F, Fernández A: Comunicación personal.
8. Martín WJ: Isolation and identification of anaerobic bacteria in clinical laboratory. A 2 year experience. *Mayo Clin Proc* 49: 300, 1974.
9. Nastro NJ, Finegold SM: Endocarditis due to anaerobic gram negative bacilli. *Am J Med* 54: 482, 1973.
10. Pien FD, Thompson RL, Martín WJ: Clinical and bacteriologic studies of anaerobic gram-positive cocci. *Mayo Clin Proc* 47: 251, 1972.
11. Swann HJC: Infections, inflammatory and allergic complications in cooperative study on cardiac catheterization. *Circulation* 37, Supl. 3: 49, 1968.
12. Washington II, JA: Comparison of two commercially available media for detection of bacteremia. *Appl Microbiol* 22: 604, 1971.
13. Weinstein L, Rubin RH: Infective endocarditis. *Prog Cardiovasc Dis* 16: 239, 1973.
14. Wilson WR, Martín WJ, Welkowske, CJ, Washington II, JA: Anaerobic bacteremia. *Mayo Clin Proc* 47: 639, 1972.

— — — —

J'aime tant ces messieurs, que, bien que je ne sois pas malade, je vais quelquefois les voir, rien que pour les voir. Il y en a qui me disent froidement:
"Vous n' êtes pas malade du tout!". Mais il y en a d'autres qui me comprennent, parce que je leur fais des mines.
Et quand ils ne te comprennent pas...?
Dame! comme je les ai dérangés inutilement, je laisse dix francs sur la cheminée.
C'est si bon et si doux, ces hommes-là!.

Los médicos

Los quiero tanto a estos señores que aunque no esté enferma, algunas veces voy a verlos, nada más que para verlos. Hay algunos que me dicen fríamente: "Ud. no está enferma en absoluto". Pero hay otros que me comprenden, porque los miro muy sugestivamente.
¿Y cuando no te comprenden?
Y como los he molestado inútilmente, les dejo 10 francos en la chimenea.
¡Son tan buenos y dulces estos hombres!

CHARLES P. BAUDELAIRE (1821-1867)
Mademoiselle Bistouri

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 75-81 (1981)

ENFERMEDAD DE LA PEQUEÑA VIA AEREA EN LA REMISION DEL MAL ASMATICO

W. O. JAUREGUI, A. J. RONCORONI, GLORIA OLMEDO

Centro Nacional de Rehabilitación Respiratoria María Ferrer, Buenos Aires

Las investigaciones de Hogg y col.[4] establecieron que el sitio de la obstrucción bronquial inicial en la bronquitis crónica, el enfisema y las bronquiectasias está en las pequeñas vías aéreas, de diámetro inferior a 2 mm. Dado que las lesiones histológicas responsables de la obstrucción son variadas (tapones mucosos, exudados inflamatorios, metaplasia de células caliciformes y fibrosis bronquial y peribronquial) y no exclusivamente inflamatorias, no puede aplicarse el término "bronquiolitis" por lo que se ideó el de "enfermedad de la pequeña vía aérea". Posteriormente esta designación se extendió a ciertos pacientes con asma bronquial que también tienen obstrucción bronquial periférica[6]. Asimismo deben incluirse bajo el mismo nombre a las lesiones provocadas por el consumo de tabaco, cuya iniciación en bronquios menores ha sido probada[8]. Se justifica la reunión de todos estos casos bajo una misma denominación porque comparten algunas peculiaridades fisiopatológicas y clínicas, que luego veremos. Sin embargo, consideramos que la expresión "síndrome de la pequeña vía aérea" sería más acertada que "enfermedad", ya que no se trata de una entidad con individualidad nosológica sino la resultante de varias enfermedades, todas capaces de obstruir la vía aérea periférica.

Recibido: 25-IX-1980. Aceptado: 15-X-1980.

Dirección postal: Centro Nacional de Rehabilitación Respiratoria María Ferrer, Finochietto 849, 1272 Buenos Aires, Argentina.

El área de sección sumada de los pequeños bronquios es mayor que la de los bronquios centrales o la de la tráquea, de manera que su aporte a la resistencia al flujo aéreo del árbol traqueobronquial en conjunto es escaso. Por lo tanto las pruebas clásicas para evaluar globalmente la obstrucción bronquial, como el volumen espirado en el primer segundo (VEF_1) y la resistencia de la vía aérea (R_{aw}), pueden dar resultados normales aun en presencia de una obstrucción considerable de los bronquíolos. Esta aparente paradoja fisiopatológica es lo más destacable en los enfermos de la pequeña vía aérea, pero no insistiremos sobre ella porque ya ha sido suficientemente analizada en otras publicaciones[6, 11]. En cambio, han sido poco destacados los rasgos clínicos que caracterizan a estos pacientes. Por ese motivo presentamos un caso de mal asmático en remisión con obstrucción de los bronquíolos por secreciones purulentas en organización, porque ejemplifica muy bien dichos rasgos. El curso de esta enferma se caracterizó por severa hipoxemia pese a que tenía escasos signos de obstrucción bronquial; también presentó marcada hipocapnia. Esto no es habitual en el asma y lo atribuimos a la localización de la obstrucción en los pequeños bronquios.

CASO CLÍNICO

Se trata de una paciente de sexo femenino y 34 años de edad que tenía antecedentes de sufrir episodios de disnea y sibilancias desde los 8 años permaneciendo asintomática en los intervalos. De-

TABLA 1. — *Espirometría forzada realizada a la paciente en el momento de ser dada de alta, luego de estar internada por un episodio de mal asmático, 6 años antes de su fallecimiento*

		Basal	Luego de bronco-dilatadores	Valor normal
CVF	(L)	2.8	3.05	3.47
VEF_1	(L)	1.73	2.19	3.14
VEF_1 / CVF	(%)	62	72	88
FEF_{25-75} %	(L / seg)	0.98	1.8	4.1

CVF: capacidad vital forzada. VEF_1: volumen espirado en el primer segundo. FEF_{25-75} %: flujo espiratorio medio entre el 25 y el 75 % de la capacidad vital. Los hallazgos de leve disminución de la CVF, descenso de la relación VEF_1 / CVF y descenso del FEF_{25-75} % que revierten significativamente luego de inhalar un aerosol con isoproterenol, son característicos del asma bronquial.

bido a que la madre y una hermana eran asmáticas se le formuló el diagnóstico de asma bronquial atópica. Debió ser internada en tres oportunidades por accesos de severa incapacidad ventilatoria catalogados como mal asmático. En una de esas internaciones pudo ser estudiada espirométricamente comprobándose los hallazgos típicos del asma, o sea obstrucción bronquial reversible con la inhalación de un aerosol con isoproterenol (Tabla 1). La última internación se debió a un nuevo cuadro de broncoespasmo que no revirtió al administrarle aminofilina y corticosteroides intravenosos y adrenalina subcutánea. Con diagnóstico de mal asmático fue derivada al Centro donde fue internada (Historia Clínica Nº 7413). En el examen físico se comprobaron: gran excitación psicomotora, cianosis central, tórax en posición inspiratoria y roncus y sibilancias difusos. Auscultación cardíaca: R_1 y R_2 de características normales. El resto del examen era normal. ECG: ritmo sinusal, AQRS + 80°, patente S_1Q_{III}. Debido a la gravedad del cuadro fue sometida a intubación orotraqueal apenas ingresada y se comenzó a ventilarla con un respirador volumétrico de presión positiva intermitente. Los primeros estudios de laboratorio dieron los siguientes resultados: hematocrito 43 %, leucocitos 16 000/mm³, Cl plasmático 100 mEq/l, Na plasmático 139 mEq/l, K plasmático 3.6 mEq/l, CO_3H plasmático 10.5 mEq/l, presión parcial de CO_2 en sangre arterial ($PaCO_2$) 46 mm Hg (con una ventilación mediante el respirador de 12 l/min), presión parcial de O_2 en sangre arterial (PaO_2) 85 mm Hg (con una fracción de O_2 en la mezcla inspirada — $F_I O_2$ — de 0.47, lo que hace un gradiente alveolo-arterial de O_2 — $AaDO_2$ — de 193 mm Hg), pH arterial 6.99 y exceso de bases de la sangre (EB) — 17.3 mEq/l. La radiografía de tórax mostraba sólo hiperinflación. Inmediatamente se inició el tratamiento con aminofilina en goteo intravenoso (3 g/día) y altas dosis de corticosteroides (48 mg/día de dexametasona) y una única dosis de 100 mEq de bicarbonato de sodio. Al 2º día de internación continuaba ventilada mecánicamente y con intenso broncoespasmo. Estaba febril y en las secreciones bronquiales se cultivó *Ps. aeruginosa.* La radiografía de tórax no tenía cambios. Durante el 5º día logró retomar la respiración espontánea al ceder la obstrucción bronquial. En la noche del mismo día presentó bruscamente un cuadro compatible con edema de pulmón: disnea con escaso broncoespasmo, secreciones acuosas aspirables por la traqueostomía, hipoxemia, hipocapnia y remisión de la sintomatología inmediatamente después de administrársele diuréticos. Se interpretó que el edema había sido secundario a un tromboembolismo pulmonar, pese a que el eje eléctrico del ECG no cambió de dirección. Se agregaron al tratamiento diuréticos, heparina y polimixina B. Una semana después de este episodio aparecieron signos de tromboflebitis en la pierna izquierda por lo que se le hizo una flebografía transcalcánea con la que se demostró obstrucción del lecho venoso profundo. Al 8º día de internación la paciente respiraba espontáneamente, se hallaba febril y con escasas secreciones y broncoespasmo. En ese momento comenzó a llamar la atención una marcada hipoxemia e hipocapnia con déficit de bases, este último probablemente debido a compensación renal de la alcalosis respiratoria, patente que se mantuvo durante el resto de la evolución (Tabla 2). Al 9º día de internación la radiografía de tórax era prácticamente normal, ya que las únicas anomalías consistían en algu-

Fig. 1. — Radiografía de tórax portátil tomada a la paciente el mismo día en que se le hicieron los estudios consignados en la Tabla 3.

TABLA 2. — *Evolución de los gases sanguíneos durante la internación*

Día	Condiciones	FIO_2	$PaCO_2$ (mm Hg)	EB (mEq/l)	pH	PaO_2 (mm Hg)	$AaDO_2$ (mm Hg)
1	ARM. $\dot{V}_E$ = 12 l/min	0.47	46	– 17.3	6.99	85	193
4	ARM. $\dot{V}_E$ = 13 l/min	0.67	40	2.3	7.43	85	343
8	Respiración espontánea. Tubo en T.	—	23	1.0	7.58	56	—
10	Respiración espontánea. Máscara tipo Venturi.	0.28	23	– 3.2	7.51	62	109
11	Idem.	0.35	18	– 5.8	7.54	70	157
13	Respiración espontánea.	0.21	23	– 5.3	7.48	66	55
15	Idem.	0.21	19	– 7.6	7.48	61	65
16	Idem.	0.21	15	– 10.0	7.51	53	78

ARM: asistencia respiratoria mecánica. $\dot{V}_E$: ventilación pulmonar mediante el respirador. FIO_2: fracción inspirada de O_2. $AaDO_2$: gradiente de PO_2 entre el aire alveolar y la sangre arterial. Nótese la hipoxemia, hipocapnia y déficit de bases que caracterizaron la evolución final de la paciente.

TABLA 3. — *Estudios realizados a la paciente en el 9º día de internación, cuando se hallaba hipocápnica y marcadamente hipoxémica*

Ventilación pulmonar ($\dot{V}_E$): 9.0 L/min
Frecuencia respiratoria (FR): 20/min — Volumen corriente (VT): 0.45 l
Espacio muerto fisiológico expresado como fracción del volumen corriente (VD/VT): 0.44

	Respirando Aire	Respirando O_2 puro
Presión alveolar parcial de O_2 (PAO_2)	106 mm Hg	672 mm Hg
Presión arterial parcial de O_2 (PaO_2)	45 ,,	140 ,,
Gradiente alvéolo-arterial de O_2 ($AaDO_2$)	61 ,,	532 ,,
Admisión venosa ($\dot{Q}_{va}/\dot{Q}_t$)	43 %	
Shunt ($\dot{Q}_s/\dot{Q}_t$)		24 %
Presión arterial parcial de CO_2 ($PaCO_2$)	35 mm Hg	33 mm Hg
Presión parcial de CO_2 al final de VT ($P_{ET}CO_2$)	28 ,,	
Gradiente arterio-alveolar de CO_2 ($PaCO_2$-$P_{ET}CO_2$)	7 ,,	
Pendiente de la curva de espiración de CO_2 ($\Delta PCO_2 / \Delta t$)	3.95 mm Hg/seg	

Obsérvese el aumento del VD/VT (valor normal alrededor de 0.3). También la importante $\dot{Q}_{va}/\dot{Q}_t$ respirando aire, que corrige parcialmente al inhalar O_2 puro, quedando un shunt del 24 %. La hipocapnia, moderada el día del estudio, no está causada por la hipoxemia, ya que no se corrige al administrar O_2 puro. El alto gradiente arterio-alveolar de CO_2 es otro modo de visualizar el aumento de VD/VT. Finalmente, la pendiente de la curva de espiración del CO_2 de 3.95 mm Hg/seg es marcadamente más empinada que la normal, de aproximadamente 1 mm Hg/seg. (Este estudio fue realizado por los Dres. A. R. Viola y E. Abbate).

nos infiltrados alveolares en el lóbulo inferior derecho y en la región parahiliar izquierda y en el borramiento del seno costofrénico derecho (Fig. 1). Ese mismo día se le realizaron algunos estudios cuyos resultados se consignan en la Tabla 3. Hacia el 12º día comenzó a manifestarse un cuadro psíquico de negativismo que llegó hasta el punto de no alimentarse correctamente, razón por la que se le puso una sonda nasogástrica para hacerlo. Tal estado mental hizo imposible que se la estudiara espirometricalmente. En el 18º día de internación, mientras se hallaba anticoagulada con acenocumarina con un tiempo de protrombina del 35 %, hizo bruscamente una hemorragia digestiva alta masiva y falleció rápidamente. Se le practicó la necropsia con los siguientes resultados: el corazón era de tamaño normal, pesaba 275 g y no presentaba hipertrofia ni dilatación. Los pulmones pesaron en conjunto 620 g; carecían del aspecto de sobredistensión que se encuentra característicamente en los pacientes fallecidos en mal asmático. Se estudiaron luego de la fijación con

formol por vía endobronquial. Sólo se encontraron lesiones en los lóbulos inferiores, predominantemente en el derecho. El parénquima pulmonar estaba moderadamente distendido, presentaba tinte ocre y estaba sembrado de nodulitos firmes, blanquecinos, de 0.1 cm de diámetro, que tenían la consistencia de perdigones. En la histología se observó que estas alteraciones estaban localizadas en los bronquíolos terminales y respiratorios cuya luz estaba ocupada por exudado francamente purulento o fibrinopurulento, en distintos estadíos de organización fibrosa y conteniendo ocasionalmente células pavimentosas de vías aéreas superiores (Fig. 2); tales lesiones eran extensas pero

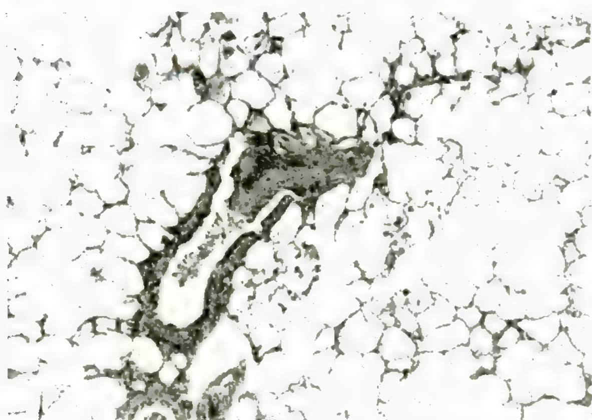


Fig. 2. — Se observa un bronquíolo obliterado por exudado organizado. Los alvéolos vecinos no muestran alteraciones. H.E. x 10.

no generalizadas. En los alvéolos próximos a los bronquíolos obliterados había neumonitis obstructiva con fibrosis de los septos alveolares (bronconeumonía acinar focal). Se encontraron además estigmas de asma bronquial: engrosamiento de la membrana basal, aumento de células mucíparas en el epitelio e hipertrofia del músculo liso bronquial en los bronquios medianos e hiperplasia de las células mucosas en bronquíolos.

Material y métodos

El espacio muerto fisiológico (VD) expresado como fracción del volumen corriente (VT) se calculó mediante la siguiente ecuación [17]: $VD/VT = (PaCO_2 - PECO_2) / PaCO_2$ donde $PaCO_2$ = presión parcial de CO_2 en sangre arterial y $PECO_2$ = presión parcial de CO_2 en aire espirado, corregida a BTPS. La presión parcial de O_2 en el aire alveolar (PAO_2) se calculó del siguiente modo [17]: $PAO_2 = PIO_2 - (PaCO_2/R)$ donde PIO_2 = presión parcial de O_2 en el aire inspirado y R = cociente respiratorio, asumido como 0.8. La admisión venosa ($\dot{Q}_{va}$) y el shunt ($\dot{Q}_s$) expresados como fracción del volumen minuto circulatorio ($\dot{Q}_t$) se calcularon así [17]: $\dot{Q}_{va}/\dot{Q}_t$ ó $\dot{Q}_s/\dot{Q}_t = (Cc'O_2 - CaO_2) / (CcO_2 - CvO_2)$ donde $Cc'O_2$ = contenido de O_2 en la sangre capilar pulmonar; CaO_2 = contenido de O_2 en sangre arterial y CvO_2 = contenido de O_2 en sangre venosa mixta; CaO_2 se calculó mediante la ecuación [17]: $CaO_2 = 1.34 \times Hb \times$ Saturación arterial $+ 0.003 \times PaO_2$ (la saturación se obtuvo de la curva standard de disociación de la oxihemoglobina a partir de la PaO_2 medida); $Cc'O_2$ se calculó mediante una ecuación similar a la de CaO_2 asumiendo que PAO_2 es igual a la presión parcial de O_2 capilar [17]; CvO_2 se calculó a partir de CaO_2 asumiendo una diferencia arteriovenosa de O_2 de 5 vol % [17]. Se estudió la PCO_2 instantánea del aire espirado durante varios ciclos respiratorios mediante un analizador a rayos infrarrojos (Capnograph Godart) obteniendo un trazado PCO_2 vs tiempo; en este gráfico se midió la PCO_2 al final del VT ($P_{ET}\,CO_2$) y con ella se calculó el gradiente arterioalveolar para el CO_2 como la diferencia $PaCO_2 - P_{ET}\,CO_2$; con la fase espiratoria del trazado se midió la pendiente $\Delta PCO_2 / \Delta t$. La PO_2 y el pH se midieron con electrodos; la PCO_2 se midió por tonometría y los parámetros del estado ácido-base se calcularon usando el nomograma curvo de Siggaard-Andersen [13, 14].

Discusión

Los antecedentes y la enfermedad actual de esta paciente son los habituales en el asma bronquial grave. Por el contrario, su evolución desde que dejó el respirador hasta el fallecimiento es infrecuente por la presencia de hipoxemia e hipocapnia severas, ya que si bien en el asma es común el descenso de la $PaCO_2$ y la PaO_2 [12] dichas anomalías guardan correlación con el grado de obstrucción bronquial y en el caso que presentamos la alteración de los gases sanguíneos fue desproporcionada con respecto al escaso broncoespasmo comprobado clínicamente.

Una complicación frecuente de los pacientes ventilados mecánicamente son las neumonías por bacilos gram negativos [3], que pueden producir hipoxemia por shunt e hipocapnia. Si bien en las secreciones bronquiales de esta paciente se cultivó *Ps. aeruginosa* y algunas de las placas radiográficas eran compatibles con la presencia de exudados alveolares, éstos eran de escasa extensión, hallazgo confirmado en la necropsia. Por lo tanto, no se puede atribuir la marcada hipoxemia al shunt que pudiera atravesar las unidades ocupadas por exudados inflamatorios. Por ejemplo, en las mediciones hechas respirando O_2 puro el día 9º y consignadas en la Tabla 3 se puede calcular un shunt del 24 % y es poco probable que tal fracción del flujo pulmonar pasase a través de las pocas unidades ocupadas con exudados neumónicos visibles radiográficamente en ese momento (Fig. 1).

En vida de la paciente se consideró que el descenso de la PaO_2 y de la $PaCO_2$ podían deberse a tromboembolismo pulmonar recurrente [7] y por tal motivo se administraron anticoagulantes. Sin embargo en la necropsia no se observaron émbolos en las arterias pulmonares ni en sus ramas pese a ser buscados cuidadosamente. Por tal motivo tal hipótesis debe ser descartada. En la autopsia tampoco se hallaron otras patologías que pudieran explicar las alteraciones de los gases sanguíneos, tales como shunt derecha-izquierda en el corazón o en los grandes vasos o alguna neumopatía intersticial difusa no visible radiológicamente. Aparentemente no hay en este caso ninguna explicación satisfactoria para la hipoxemia excepto la obstrucción de los pequeños bronquios. Por lo tanto, luego de hacer algunas consideraciones sobre la imagen histológica, trataremos de esbozar el mecanismo patogénico que puede haber obrado en este caso a partir de la oclusión de los bronquíolos.

En los pacientes asmáticos fallecidos por otra enfermedad se encuentra habitualmente engrosamiento de la membrana basal, hipertrofia del músculo liso bronquial e hiperplasia de células mucíparas [2]. En los fallecidos a causa de un episodio de mal asmático se agregan múltiples tapones mucosos en los bronquios de mediano y pequeño calibre [2, 10]. En el caso que presentamos había, además de estigmas histológicos de asma como los descriptos, evidencia de obstrucción de los bronquíolos terminales y respiratorios (de calibre inferior a 2 mm) por exudados en organización (bronquiolitis obliterante). Si bien hay unanimidad de opiniones en cuanto a definir a la pequeña vía aérea como la porción del árbol bronquial de calibre inferior a 2 mm [6], en algunas publicaciones se establece además que quedan excluidos de la definición los bronquíolos alveolados, o sea los respiratorios [15]. El caso que presentamos satisface el primer criterio pero no el segundo, y de acuerdo a éste no podría catalogarse como "enfermedad de la pequeña vía aérea", sino que pertenecería a otra entidad no definida. Sin embargo, opinamos que ya que la obstrucción de los bronquíolos respirotorios tiene el mismo comportamiento fisiopatológico que la de los bronquíolos terminales, es más correcto clasificar a este paciente dentro del grupo de enfermos de la pequeña vía que considerarlo como una enfermedad nueva de cuestionable individualidad. No tenemos una explicación satisfactoria acerca de la causa de la retención de estas secreciones, prolongada hasta tal punto que comenzaron a organizarse. Podría conjeturarse que la hipersecreción de mucus que se produce durante el episodio de mal asmático sumado a la hipoxemia hayan contribuido a deprimir el transporte ciliar que es el principal mecanismo de limpieza de los pequeños bronquios [16].

De acuerdo con la imagen anatómica se puede elaborar el siguiente mecanismo fisiopatológico hipotético. La severa hipocapnia puede atribuirse, como en general se acepta para el asma bronquial [4], a un aumento de las aferencias excitadoras del centro respiratorio a través del nervio vago y a partir de los receptores de la pared bronquial estimulados por mediadores. La hipoxemia no ha jugado un papel importante, ya que la $PaCO_2$ no subió al inhalar O_2 al 100 %. De los 4 mecanismos clásicos de hipoxemia (hipoventilación, shunt, irregularidad de ventilación-perfusión y disminución de la difusibilidad para el O_2), cabe aquí discutir sólo los 3 últimos. La hipoxemia en nuestro caso se caracterizó por corregir parcialmente al inhalar O_2 puro. El hecho que haya aumentado la PaO_2 al respirar O_2 al 100 % significa que la hipoxemia era debida, en parte, a irregularidad de ventilación-perfusión ($\dot{V}/\dot{Q}$) y/o déficit de difusibilidad, causados por exudados o edema intersticiales en el caso del defecto de difusión y por broncoobstrucción en el de la irregularidad de $\dot{V}/\dot{Q}$ *. Los hallazgos en la curva de con-

— — — —

* Si bien el concepto clásico establece que la hipoxemia por cortocircuito no se corrige al inhalar O_2 100 %, en realidad se produce una pequeña mejoría de la PaO_2 debido al aumento del O_2 disuelto de la sangre que atraviesa los alvéolos ventilados. Sin embargo tal corrección es de menor magnitud que la que se obtiene en la irregularidad de $\dot{V}/\dot{Q}$ o en los trastornos de difusión y no daría cuenta del aumento de PO_2 observado en el paciente que presentamos, en el hipotético caso de que su trastorno de hematosis fuera solamente de tipo shunt. Tomemos por ejemplo los datos de la Tabla 3 y admitamos que la $\dot{Q}_{va}$ fuera debida íntegramente a cortocircuito. Al respirar O_2 100 % el 57 % del $\dot{Q}_t$ ($\dot{Q}_t$-$\dot{Q}_s$) capta 1.7 vol %

centraciones de CO_2 espirado son otra prueba de que la paciente presentaba irregularidad de $\dot{V}/\dot{Q}$. La excesiva pendiente $\Delta PCO_2 / \Delta t$ significa que la PCO_2 alveolar de las unidades que se vacían primero es marcadamente menor que la de las que lo hacen último. Como en cada unidad la PCO_2 es función de su $\dot{V}/\dot{Q}$, se puede inferir que tales unidades rápidas tienen $\dot{V}/\dot{Q}$ más alto que las lentas, o sea que hay irregularidad de $\dot{V}/\dot{Q}$. Más difícil de explicar es el marcado shunt que se hizo evidente en la forma de hipoxemia persistente al inhalar O_2 puro (Tabla 3). En un estudio realizado en nuestro Centro[5] sobre un grupo de 11 pacientes con mal asmático que tenían una admisión venosa de 32.9 ± 2.75 % (media ± 1 desvío standard), se observó que al inhalar O_2 puro corregían la hipoxemia importantemente, quedando un shunt de 11.3 ± 1.24 % ($p < 0.001$); estos hallazgos son compatibles con la interpretación de que la hipoxemia en esos casos era debida en su mayor parte a irregularidad de $\dot{V}/\dot{Q}$ secundaria a broncoobstrucción. El paciente que presentamos tenía una $\dot{Q}va$ similar (43 %) pero el shunt era mayor (24 %). En el presente caso, descartado el shunt en las cavidades cardíacas o en los grandes vasos, el cortocircuito debe haberse producido necesariamente en el parénquima pulmonar. Las mínimas condensaciones neumónicas visibles en la radiografía de tórax y comprobadas en la necropsia no justifican un cortocircuito de la magnitud estimada. Es probable entonces que el shunt se produjera en ciertas aéreas con obstrucción bronquial virtualmente completa, de tal modo que su ventilación fuese casi nula y, en consecuencia, la sangre que circulaba a través de ellas no estuviera expuesta al aumento del O_2 de la mezcla inspirada.

Con respecto a las radiografías de tórax, en la enfermedad de la pequeña vía aérea ha sido descripta una patente retículo-nodulillar[6] debida a la superposición de trazos lineales y nodulillos causados por la inflamación bronquial. En el caso que presentamos no se visualizó tal patente pese a que en los cortes histológicos se hallaron los elementos que podrían haberla provocado.

La acidosis mixta (pH 6.99, $PaCO_2$ 46 mm Hg y EB −17.3 mEq/l) que presentaba la paciente al ingresar, merece un comentario final. La hipercapnia es un signo de gravedad en el asma bronquial y sólo se observa en casos de obstrucción extrema o de iatrogenia por administración de sedantes (y a la vez depresores del centro respiratorio); fuera de estas circunstancias lo habitual es la hipocapnia. El déficit de bases es un hallazgo frecuente y no completamente explicado, ya que el aumento de la lactacidemia (secundario al esfuerzo muscular, a la administración de adrenérgicos[9] u otras causas) sólo da cuenta de alrededor del 50 % de las bases perdidas y, hasta el momento, no se ha identificado la acumulación de otro ácido ni ningún sitio de pérdida de bicarbonato[12]. Cualquiera sea la etiología, la corrección de la acidosis metabólica es un punto importante en el tratamiento del asma grave, ya que restablece la responsividad de los receptores adrenérgicos a las catecolaminas broncodilatadoras disminuida por el descenso del pH.

— — — —

adicionales en forma de O_2 disuelto (0.003 × PAO_2). Al mezclarse en la aurícula izquierda con el 43 % del $\dot{Q}t$ que atraviesa el cortocircuito, el O_2 ganado se diluiría y produciría un incremento del contenido de O_2 en la sangre arterial de 0.97 vol %

$$\frac{(1.7 \text{ vol } \% \times 57 \% \dot{Q}t)}{\dot{Q}t}$$

En tal caso la saturación arterial subiría de 84 % (PaO_2 45) a aproximadamente 89 %:

$$\frac{(1.34 \times Hb \times 84 \% + 0.97 \text{ vol } \%)}{20 \text{ vol } \%}$$

o sea, hasta una PaO_2 de alrededor de 51 mm Hg. En realidad la PaO_2 del paciente subió a 154, lo que significa que la admisión venosa no era debido sólo a shunt sino también a irregularidad de $\dot{V}/\dot{Q}$ y/o déficit de difusibilidad.

Resumen

Se presenta el caso de una paciente que falleció por una hemorragia digestiva mientras se recuperaba de un episodio de mal asmático. En la necropsia se halló extensa obstrucción bronquiolar por exudados en organización. La paciente presentaba como rasgos clínicos salientes hipoxemia e hipocapnia severas pese a que la radiografía de tórax era prácticamente normal y a que

tenía escasos signos semiológicos de obstrucción bronquial. Con la inhalación de O_2 puro se comprobó que la hipoxemia era debida en su mayor parte a shunt, probablemente a través de unidades con oclusión bronquiolar virtualmente completa. Los hallazgos patológicos permiten atribuir el cuadro funcional al síndrome de obstrucción de las pequeñas vías aéreas.

Summary

SMALL AIRWAY DISEASE IN THE REMISSION OF STATUS ASTHMATICUS.

The patient presented was admitted in severe status asthmaticus and metabolic acidosis (Table 2) was observed during artificial mechanical ventilation. A few days later, during recovery, a clinical picture compatible with acute lung edema considered presumptively due to pulmonary thromboembolism was treated with anticoagulants. Concomitantly increasing hyperventilation accompanied by hypocapnia and hypoxemia was noted (Table 2). This last condition persisted reaching Pa Co_2 to a low level of 15 mm Hg. Except for a few scattered alveolar infiltrates at right lower lobe and left parahilar zone, the lungs were normal at X-ray (Fig. 1). Physiological studies showed PO_2 alveolar-oxygen gradient to be 61 mm Hg breathing air and 532 breathing O_2. Venous admixture was 43 % and shunt 24 % (Table 3). Further studies involving voluntary cooperation were impossible due to exacerbation of a previous psychiatric condition. On day 18, the patient died suddenly after profuse hematemesis. At necropsy the lungs, which were not hyperinflated, showed many firm small nodules. These were found to be terminal or respiratory bronchioles filled with purulent or fibrinopurulent exudate in different degrees of fibrous transformation (Fig. 2). In some nearby alveoli, obstructive neumonitis with septal fibrosis was observed. Usual changes associated with asthma vere found in the bronchi. There were no signs of pulmonary embolism. The pathological findings were interpreted as small airway disease [6] secondary to status asthmaticus. Venous admixture may be attributed to irregularities of ventilation-perfusion and true shunt to lack of ventilation of lung units subserved by completely obstructed bronchi.

Bibliografía

1. Derenne JPh, Macklem PT, Roussos Ch: State of the art: the respiratory muscles: mechanics, control, pathophysiology. *Am Rev Resp Dis* 118: 119, 1978.
2. Dunnill MS: Pathology of athma. Transactions of the World Asthma Conference. London 23-26, March 1965.
3. Gené R, Olmedo G, Ragoni D, Roncoroni AJ: Bronconeumonía por gérmenes gram negativos en enfermos tratados con asistencia respiratoria mecánica. *Medicina (Bs Aires)* 36: 234, 1976.
4. Hogg JC, Macklem PT, Thurlbeck WM: Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. *New Engl J Med* 278: 1355, 1968.
5. Lingua J, Di Gresia C, Roncoroni AJ: Comunicación personal.
6. Macklem PT, Thurlbeck WM, Fraser RG: Chronic obstructive disease of small airways. *Ann Int Med* 74: 167, 1971.
7. Moser KM: Pulmonary thromboembolism. Cap 266, p 1403 de Harrison's Principles of Internal Medicine. Mc Graw-Hill Book Company, New York, 1977.
8. Niewoehner DE, Kleinerman J, Rice DB: Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *New Engl J Med* 291: 755, 1974.
9. Oliva PB: Lactic acidosis. *Am J Med* 48: 209, 1970.
10. Reid L: The pathological changes in asthma. Cap 4, p 79-95 de "Asthma", editado por T. J. H. Clark y S. Godfrey W. B. Saunders Co, 1977, Filadelfia.
11. Roncoroni AJ: La pequeña vía aérea. *Medicina (Bs Aires)* 36: 347, 1976.
12. Roncoroni AJ, Adrogué HJ, de Obrutzky C W, Marchissio ML, Herrera MR: Metabolic acidosis in status asthmaticus. *Respiration* 33: 85, 1976.
13. Siggaard-Andersen O, Engel K: New acid-base nomogram: improved method for calculation of relevant blood acid-base data. *Scandinav J Clin Lab Investigation* 12: 177, 1960.
14. Siggaard-Andersen O, Engel K, Jorgensen K, Astrup P: Micromethod for determination of pH, carbon dioxide tension, base excess and standard bicarbonate in capillary blood. *Scandinav J Clin Lab Investigation* 12: 172, 1960.
15. Kenichi M, Thurlbeck WM: Disease of the small airway in chronic bronchitis. *Am Rev Resp Dis* 107: 552, 1973.
16. Wanner A: State of the art. Clinical aspects of mucociliary transport. *Am Rev Resp Dis* 116:: 73, 1977.
17. West JB: Fisiología respiratoria. Editorial Panamericana, Buenos Aires, 1976.

 ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 82-94 (1981)

LINFOMA DE BURKITT Y COMA METABOLICO

V. S., 73 años, sexo femenino, H. C. Nº 55 205. Autopsia Nº 2323. Ingresó el 20-XII-79 y falleció el 26-I-80.

Comienza su enfermedad 2 meses antes de su ingreso con astenia, adinamia, hiporexia y febrícula matinal que en el transcurso del día se eleva a 39° C, no acompañada de escalofríos ni sudoración. Es vista por distintos médicos y tratada con paracetamol, tetraciclina, oleandomicina y rifamicina sin mejoría del cuadro clínico. Un mes después es internada en una clínica, donde presenta como complicación un paro cardíaco; se le efectúan diversos análisis, encontrándose hematocrito 35 %, leucocitos 8900 mm^3, eritrosedimentación 98 mm en la primera hora, GOT 17 mU/ml, GPT 14 mU/ml, rectosigmoideoscopía hasta 24 cm normal. Es dada de alta con igual sintomatología persistente hasta el momento de su ingreso al IDIM.

Antecedentes personales: hipertensión arterial sistólica y diastólica (170/110) de 30 años de evolución. En 1970 presenta extrasístoles, diagnosticándose Enfermedad de Chagas (Machado Guerreiro positiva). En 1954 hemiparesia faciobraquial izquierda, que coincidió con una tensión arterial de 280/160. Constipada habitual, detectándose en 1968 un megacolon. En 1979 ardor hepigástrico, que calma con la ingesta. En 1949 litotomía derecha, a los 39 años histerectomía por mioma uterino. Examen físico al ingreso: paciente lúcida, febril, en buen estado general, con secuela de hemiparesia facio-braquial izquierda. Adenomegalia látero-cervical derecha indolora de 5 x 4 cm. Tensión arterial, 180/110. Análisis de laboratorio: sodio plasmático 130 mEq/l; potasio 3.4 mEq/l; urea 0.30 g/l; hematocrito 35 %; leucocitos 7000 mm^3; eritrosedimentación 114 mm en la primera hora; glucemia 1.21 g/l; bilirrubina total 1 mg %; colesterol 120 mg %; creatinina 1.11 mg %; ácido úrico 5.1 mg %; fosfatasa alcalina 54 mU/ml; GOT 12 mU/ml; GPT 6 mU/ml; 2 M.E. Chagas positivo. ECG: bloqueo completo de rama derecha. Rx de tórax: leve cardiomegalia. Rx de abdomen: compatible con megacolon. Pielografía: normal. Laringoscopía: normal. Punción de médula ósea: aumento de células plasmáticas y linforreticulares e hierro de depósito disminuido. Durante su internación se descubre la presencia de una tumoración redondeada en hemiabdomen izquierdo, desplazable, compatible con adenopatía mesentérica, y una adenopatía axilar izquierda de 2 x cm, y otra adenopatía prepúbica de 3 x 2 cm. Se efectúa biopsia ganglionar cervical, cuyo resultado demuestra la presencia de un linfoma maligno indiferenciado tipo Burkitt.

5-I-80: Luego de intentar una rectosigmoidescopía presenta taquicardia, taquipnea, escalofríos, piel pálida y sudorosa. T. axilar 39°; T. rectal 39°; hematocrito 38 %; leucocitos 6400 x mm^3 (Seg N 78 %, linfo 17 %); proteínas totales 6.2 g %; albúmina 2.47 g %; gama globulina 1.74 g %; calcio 10.1 mg %; fósforo inorgánico 4.4 mg %; urea 0.30 g %; natremia 129 mEq/l; kalemia 3.2 mEq/l. 10-I-80: Recibe tratamiento con ciclofosfamida, vincristina, metotrexate, leucovorina, metilprednisona, bicarbonato de sodio, acetazolamida, allopurinol. 10-I-80: Distensión abdominal. Se coloca sonda rectal eliminando gases y materia fecal. Centellograma hepático: hígado de tamaño normal, forma alterada, áreas frías en región anterior e interna del lóbulo derecho. Centellograma óseo: área de acumulación patológica en fémur izquierdo, resto del esqueleto sin particularidades. Uricemia 1.5 mg %; creatininemia 1.14 mg %; urea 0.60 mg %; natremia 126 mEq/l; leucocitos 7.200 x mm^3. 20-I-80: Paciente en coma sin respuesta al dolor: arreflexia generalizada; reflejo fotomotor ausente; natremia 114 mEq/l; kalemia 2 mEq/l; urea 0.40 mg %. Electroencefalograma: actividad lenta delta aislada, bisincrónica generalizada, con predominio anterior. Electrocardiograma: extrasístoles supraventriculares. Alteraciones primarias de la repolarización. Se reponen 556 mEq/l de sodio en 24 horas, y 24 horas después la paciente está conectada con el medio ambiente, respondiendo en forma lenta al interrogatorio. 23-I-80: obnubilada, con marcada distensión abdominal. Edemas en miembros inferiores 3/6. Hematocrito 28 %; leucocitos 1200 x mm^3; glucemia 1.68; natremia 131 mEq/l; natriuria 12 mEq/l; uremia 0.70 mg %; amoníaco 3.25 γ/l; PO_2 70; PCO2: 20.5; bicarbonato 17; pH 7.53. Exceso de base –6.5; kalemia 3.8 mEq/l. Médula ósea (por biopsia con aguja de Jamshidi) moderada aplasia medular. 25-I-80: obnubilada. Febril. Abdomen muy distendido y tenso. No se auscultan ruidos hidroaéreos. Edemas generalizados. Hipotensa (90/70). Quemosis. Anuria. Anisocoria. Bilirrubina total 5.6 mg %; bilirrubina directa 4.6 mg %; colesterol 86 mg %; natremia 137 mEq/; kalemia

— — — —

Reunión anatomoclínica efectuada en el Instituto de Investigaciones Médicas el 3-X-1980. Editores: Dres. M. A. Castro Ríos y H. J. Delisio.

3.3 mEq/l; hemocultivos seriados negativos; uremia 1.05 mg %. 26-I-80: A las 2 horas paro cardiorrespiratorio, fallece.

Discusión radiológica

Dr. G. Mundt: En la radiografía de tórax no se observan alteraciones; un mes más tarde en una nueva radiografía de tórax se observa que los diafragmas están sobreelevados, que puede corresponder a la presencia de ascitis. Una radiografía directa de abdomen muestra la gran distensión del colon por el megacolon. La pielografía realizada muestra un riñón derecho algo disminuido de tamaño y una dudosa expansión hacia afuera de las zonas renales por adenopatías, pero la imagen no es concluyente.

Discusión clínica

Dr. L. M. Gagliardi: Esta es una enferma de 73 años que se interna en el Instituto por fiebre prolongada. Había comenzado dos meses antes con temperaturas vespertinas de hasta 39° y sin otros síntomas destacables. A su ingreso se le encuentra, en el examen físico, una adenopatía en región lateral del cuello y masas abdominales bilaterales, desplazables, algo dolorosas, compatibles con adenopatías abdominales, pelvianas y/o retroperitoneales voluminosas. La histología arrojó el diagnóstico de linfoma no diferenciado tipo Burkitt, que es su principal enfermedad. La muerte está vinculada a las complicaciones de la enfermedad en sí y a las complicaciones, en parte, del tratamiento, ya que tenía otros antecedentes aparentemente no relacionados con su enfermedad de base, como son, por ejemplo, una probable miocardiopatía chagásica, la presencia de hipertensión arterial, y los accidentes vasculares cerebrales, que no hacen al curso de su enfermedad actual.

En primer lugar, llama la atención la rareza de este diagnóstico en un grupo etario como la de esta enferma en la octava década de la vida. En general el Burkitt, ya sea tipo americano o el tipo africano se da en poblaciones que están alrededor de la primera o de la tercera década de la vida, y es por demás infrecuente encontrar publicaciones acerca de pacientes que sobrepasan la cuarta o la quinta década.

El linfoma de Burkitt fue descripto aproximadamente hace unos 20 años en una zona endémica de Africa, y en chicos. Se creyó, primero, que era un sarcoma que tomaba característicamente los huesos de la mandíbula. Se vio, además, que histológica, histoquímica y citológicamente era exactamente igual al Burkitt que se veía en otras zonas africanas en forma no endémica, y que también tenía enorme similitud histológica y citológica con los linfomas de otras regiones del mundo, por ejemplo, los EE. UU., o los que se ven en otras latitudes de Africa, pero que tienen una diferente presentación clínica. Por ejemplo: la menor frecuencia en la incidencia de participación mandibular y la mayor frecuencia de participación abdominal, pelviana, ovárica, mamaria y endocrina, y la mayor tendencia de estos pacientes a tener un tipo muy particular de remisión: a diferencia de la remisión con recaída temprana del africano, ésta está caracterizada por una remisión temprana también, pero con una recaída tardía, que la pone en una situación exactamente igual a la del pretratamiento, a diferencia de la remisión con recaída temprana del Burkitt africano endémico, que la pone en una situación de relativa resistencia terapéutica. Estos son linfomas B, y como tales, aparentemente son linfomas de centro germinativo. De ahí la particular característica de los marcadores de inmunoglobulina monoclonales de superficie y de complemento que lo asemejan a los linfocitos B, tanto de las células tumorales como de las no tumorales. Esta enferma tuvo un curso, yo diría, exactamente igual al no endémico con la salvedad de la edad, pero con una complicación que fue una aplasia medular, probablemente medicamentosa, y un coma de tipo metabólico. En cuanto a los comas metabólicos y a los disturbios metabólicos del Burkitt es sabido que se presentan innumerable cantidad de complicaciones vinculadas a insuficiencia renal aguda, hiperkalemia, hipocalcemia, hiperfosfatemia, y que las mismas se deben a efectos colaterales del tratamiento debido a que el enorme recambio celular que tienen estos tumores y la lisis producida en los mismos por la quimioterapia

los hace liberar una gran cantidad de ácidos nucleicos que son responsables de la nefropatía aguda por ácido úrico con insuficiencia renal aguda y de los cambios metabólicos secundarios a ésta, que los pone hiperkalémicos debido a la lisis aumentada de células en poblaciones tumorales sumamente activas. Acá, aparentemente, no sucedió ninguna de estas complicaciones. Incluso la paciente tuvo hipokalemia y uno puede inferir que tal vez fue debida a los vómitos persistentes que tuvo la enferma durante las 48 horas que siguieron al tratamiento inicial.

Se ha descripto un cuadro que es el de muerte súbita por lisis tisular acelerada, pero parece que éste no es el caso, ya que las muertes súbitas se producen por la combinación de hiperkalemia e hipocalcemia, situación que no se dio en nuestra enferma. Sí, sucedió una encefalopatía de tipo metabólico, quizás vinculada a una intoxicación acuosa, ya que la enferma estaba con hidratación parenteral, y con cantidades bastante importantes de hidratación oral; este cuadro se corrigió con restricción hídrica y aporte de sodio. Llamó la atención que después de corregida la intoxicación acuosa y después de una mejoría inicial, la enferma tuvo un nuevo episodio de encefalopatía caracterizado por confusión y ahí se nos ocurrió que quizás éstos fueran los comienzos de un coma hepático, ya que tenía un centelleograma de hígado con aumento de tamaño del mismo y algunas zonas con distribución irregular del trazador. Esto y la presencia de un tumor abdominal que tiene una alta incidencia de invasión hepática como es el Burkitt aumentaban la suposición clínica. Los otros estudios complementarios parecían confirmatorios, ya que llegó un amoníaco extremadamente alto y no tenía ninguna condición como para tener hiperamoniemia por otra causa diferente de la enfermedad del hígado. Cuando ingresó tenía una función hepática normal, ya que tenía bilirrubina, enzimas hepáticas y un tiempo de coagulación normal, y se muere con hiperamoniemia y con hiperbilirrubinemia de 5.6 mg %. Yo creo que esto se puede deber perfectamente a una invasión tumoral masiva del hígado con encefalopatía portosistémica, y fallo hepático agudo. Creo que la insuficiencia renal aguda corresponde a un síndrome hepatorrenal, es decir, a una alteración funcional de los riñones secundaria a una enfermedad grave del hígado, va que el sodio baja abruptamente en la orina cuando comienza a subir la urea. Aunque debo volver a mencionar alguno de los mecanismos patogénicos que llevan a la insuficiencia renal aguda a estos enfermos, como son la infiltración de los riñones y la nefropatía aguda por ácido úrico, que, estadísticamente son las principales causas de insuficiencia renal; pero no es éste el caso.

En síntesis, creo que esos son los diagnósticos más importantes y que el diagnóstico es de Burkitt tipo americano no endémico con participación sistémica múltiple de ganglios abdominales y probablemente viscerales.

Hay algo que me olvido de comentar y es una anisocoria. Yo no recuerdo, esto figura en la historia y aparentemente ningún otro dato más. Un signo de foco es extremadamente raro en encefalopatías metabólicas, y convendría acordarse de los raros signos de foco pupilares que a veces tiene temporariamente la encefalopatía portosistémica. Otra causa de anisocoria es una pupila de Behr, o sea una pupila midriática por estímulo de la vía cruzada por invasión cortical, o que tiene directamente un trastorno estructural del tronco cerebral, para lo cual llama la atención la ausencia de descripción de otros signos de igual nivel, a menos que en realidad los haya tenido y uno no los hubiese detectado. Otra posibilidad es que tenga edema cerebral con un enclavamiento incipiente del uncus. Pero no hay que olvidar tampoco que el Burkitt americano, sobre todo cuando tiene invasión medular, cosa que acá no fue comprobada tiene, a veces, al igual que la leucemia linfoblástica aguda, invasión del sistema nervioso central, y esos son enfermos de una particular gravedad ya que son resistentes a la quimioterapia y ofrecen muchas dificultades. No es éste el caso por la ausencia de invasión medular, pero es una de las posibilidades que debe discutirse cuando uno se enfrenta con un Burkitt no endémico que presenta un cuadro neurológico focal.

Dr. E. E. Benarroch: Para poder ser concreto en la discusión de un caso, es

necesario tener disponibles datos confiables del examen físico, que en esta circunstancia, desafortunadamente, no existen. Por otra parte, es una lástima que una enferma que estuvo en coma en los últimos 5 a 6 días de internación, sólo tenga escritas en la historia clínica, dos evoluciones separadas con tres días de diferencia. Esto me obliga a especular acerca de qué le pudo haber sucedido a esta paciente desde el punto de vista neurológico. De todos modos, creo que hay cuatro aspectos, de distinta jerarquía clínica, a discutir. El primero es la secuela de hemiplejía izquierda en un paciente con una hipertensión arterial de 30 años de evolución. Es improbable que una enfermedad hipertensiva que ha producido una encefalopatía grado 3 (la secuela de hemiplejía) se acompañe de un fondo de ojo grado 1 como señala la historia. Relacionado con esto, hay que acordarse que un paciente con hipertensión tiene su curva de autorregulación circulatoria cerebral desplazada a la derecha, lo que lo hace particularmente susceptible a caídas bruscas de la tensión arterial, que pudieron haber contribuido —aunque no parece demasiado importante— a su cuadro neurológico. El segundo aspecto es el del compromiso chagásico del sistema nervioso. Si bien el compromiso meningoencefalítico del Chagas se ha descripto en el período primario de la enfermedad, este paciente estaba inmunodeprimido por el linfoma y por el tratamiento quimioterápico, lo que no permite descartar, extrapolando con lo que ocurre con la toxoplasmosis por ejemplo, la posibilidad de una meningoencefalitis chagásica en este caso, a pesar de que es muy raro. Es conveniente, ante un caso neurológico poco claro, realizar una punción lumbar, lo cual hubiera sido muy útil porque nos permitiría evaluar dos diagnósticos: 1º el de una meningoencefalitis, y 2º el de una infiltración leptomeníngea por el linfoma, la que daría una caída muy importante de la glucosa en el líquido cefalorraquídeo, un dato muy orientador.

Respecto del compromiso del Chagas en el sistema nervioso periférico, hay un trabajo publicado en *Medicina (Bs Aires)* número 40, Suplemento 1: 231, 1980, donde se describen cambios en las motoneuronas alfa en algunos portadores (aún asintomáticos) de la enfermedad. Uno de los aspectos llamativos que presentaba el paciente era una debilidad de los miembros inferiores, de grado tal que le impedía deambular, lo que podría ser explicado —aunque no hay posibilidad de confirmarlo— por una alteración de la motoneurona secundaria al Chagas. Respecto al compromiso neurovegetativo del Chagas, la presencia del megacolon podría sugerir la posibilidad de un compromiso de las neuronas post ganglionares (aunque es raro en el Chagas de nuestro país). Sin embargo, hay dos factores muy importantes, como son la hipokalemia y la vincristina, que pueden haber jugado un papel en la producción del megacolon. Respecto al íleo por vincristina, en una muy buena revisión sobre el tema, se lo describe como una complicación mortal en gran porcentaje de los casos, que se manifiesta por una distensión aguda que se instaura en 9 a 24 horas precedida por calambres abdominales, que este paciente también presentó. Por lo tanto, se puede especular que la asociación de la vincristina más la hipokalemia —y el posible pero raro compromiso chagásico— podría haber determinado la aparición del megacolon. Este puede ser un foco importante de infección y la posibilidad de un cuadro séptico final no se puede descartar del todo. Esta enferma presentaba debilidad en los miembros inferiores que, si no se tienen elementos al examen físico extraíbles de la historia clínica, obligan a buscar su explicación, si no en el compromiso medular por el Chagas, en la hipokalemia. En realidad, el paciente, en el momento que presentaba la debilidad muscular, tenía el potasio descendido. La debilidad muscular hipokalémica tiene algunas características tales como, por ejemplo, la conservación de la motilidad ocular extrínseca, como parecía ocurrir en este caso. Además, una enferma con estas características era muy difícil que no estuviera hipokalémica porque estaba tratada crónicamente con enemas, recibía bicarbonato y acetozolamida y tenía un tercer espacio. Si se quiere especular más, se podría mencionar una miopatía de origen paraneoplásico como causa de su debilidad, pero no se ha hecho un electromiograma

y no hay otros elementos clínicos para confirmarla. Y respecto al elemento que más llama la atención, por lo menos el que más parece justificar la intervención de la sección Neurología en este caso, es el coma. Cuando se está frente a un paciente en coma, interesan varias cosas para poder hablar de la patogenia de ese cuadro, y desgraciadamente esas cosas que a uno le interesan no se encuentran en la historia. Una de las más importantes es cómo empezó el trastorno de conciencia. Si se quiere saber si el coma es de tipo metabólico o estructural una de las preguntas fundamentales es si el paciente entró bruscamente en coma o entró de a poco. Desgraciadamente, la paciente estaba lúcida y orientada el día 8, el día 12 estaba en coma y entre esos días no sabemos nada de lo que pasó. Esto hace realmente imposible cualquier aproximación racional al diagnóstico del coma, aunque uno esté muy tentado de pensar que se trata de un coma metabólico. A favor del mismo están lo fluctuante del cuadro clínico y la tendencia que uno tiene a pensar que los disturbios generales que tenía esta enferma, entre ellos la hiponatremia, por ejemplo, podrían justificar la presencia de un edema cerebral como causa del coma. De todos modos, como decía el Dr. Gagliardi, hay un elemento que molesta bastante para el diagnóstico de coma metabólico y son los trastornos óculomotores descriptos en la historia. El día 20 ó 18 se describe que la paciente tenía pupilas de tamaño intermedio, sin reacción a la luz y el día 21 se describe "sigue anisocórica". Uno se pregunta cuándo empezó a estar anisocórica, aunque de todos modos, si uno piensa en una lesión estructural que dé pupilas intermedias arreactivas la ubica en el tegumento mesencefálico, lo que no hubiera dado un cuadro clínico tan fluctuante. Sin embargo, hubiera justificado un signo que presentaba esta paciente y que vale la pena tener en cuenta para el diagnóstico diferencial de las causas de coma y que es la hiperventilación, pues tenía una pCO_2 baja y un pH de 7.54. Sin embargo, tenía muchas causas de hiperventilación tales como la insuficiencia hepática —si es que la tuvo—; una sepsis que pudo haber complicado su cuadro; una anemia aguda si sangró, o puede haber hiperventilado por un compromiso inicial del SNC, en este caso, una encefalitis o una lesión mesencefálica, la cual cuesta mucho sostener dado que la paciente mejora con la reposición de sodio, la que hubiera producido resultados desastrosos en presencia de dicho compromiso estructural. La presencia de anisocoria hace pensar que la enferma tiene un compromiso del III par periférico o presentó una hernia del uncus. En este último caso no hubiera tenido 3 o 4 días de evolución ya que la presencia de anisocoria es un signo ominoso que se sigue con la muerte del paciente en pocas horas. Por lo tanto, el enclavamiento del uncus se hace difícil, a pesar de que la enferma es una buena candidata para presentar edema cerebral. Si pensamos en un compromiso del III par periférico, hay 2 o 3 causas que vale la pena discutir. En primer lugar, la toxicidad por vincristina que, además de comprometer los nervios espinales también lo hace con los nervios craneales, en particular los óculomotores. Luego está la posibilidad de una infiltración leptomeníngea por el linfoma, como decía el Dr. Gagliardi, en una enferma que aparentemente no tuvo mucho tiempo para responder a la quimioterapia. Por último, en una paciente que presenta aumento de la temperatura, disminución de su estado de conciencia y lesión de un par craneal sugiere, en un determinado contexto, como la inmunosupresión en este caso, la posibilidad de una encefalitis viral por ejemplo, por el virus de Epstein Barr aunque el linfoma americano no parece estar muy relacionado con el mismo. De todos modos, son especulaciones que surgen de la falta de datos del examen físico, nada más. Respecto a las probabilidades diagnósticas, en este caso me inclino hacia un coma de causa metabólica. Tres elementos vale la pena tener en cuenta en este caso: la hiponatremia, la hiperamoniemia y el cuadro general que la predisponía a complicaciones tales como una sepsis, por ejemplo.

Respecto a la hiponatremia, era bastante probable que la paciente la presentara porque seguramente estaba normohidratada en ese momento, que obliga como tratamiento a la restricción hídrica o a la reposición salina hipertónica y no a la admi-

nistración de salina isotónica como muestra la historia, la cuál sólo pudo haber producido un leve y transitorio aumento de la natremia y luego, por el daño de la membrana celular por la hiperamoniemia o la sepsis, el exceso acuoso iba a pasar a la neurona. Esto explica la mejoría transitoria del cuadro y luego el empeoramiento. Además, la enferma entró en anasarca a los dos o tres días de la reposición, lo cual apoya la posibilidad de que estuviera sobrehidratada sin haber corregido demasiado su natremia. En ese sentido, uno está acostumbrado a leer que por encima de 120 mEq/l, la hiponatremia no se acompaña de síntomas neurológicos, pero, si la paciente tiene una hiperamoniemia u otra causa de daño de la bomba de sodio de la membrana, o cuando la caída del sodio es lo suficientemente rápida como para modificar la osmolaridad, la enferma puede tener una encefalopatía por hiponatremia con cifras superiores a los 120 mEq/l. Creo que la hiponatremia es el candidato más importante como causa del coma en esta paciente.

Respecto a la hiperamoniemia que presentaba, es evidente que el amoníaco a esa concentración es tóxica e incluso puede potenciar los efectos de la hiponatremia. Lo que llama la atención es la falta de cualquier otra manifestación clínica orientadora hacia el diagnóstico de encefalopatía hepática salvo la hiperventilación para la cual, como ya vimos, puede haber otras explicaciones.

En resumen, yo creo que esta enferma muy probablemente tenga un edema cerebral citotóxico por hiponatremia. No se puede descartar, sin embargo, la posibilidad de que presente un infiltrado leptomeníngeo por el linfoma o una meningoencefalitis. En este caso es muy atractiva la posibilidad de una etiología chagásica para la misma, pues se ha descripto Chagas agudo en enfermos inmunodeprimidos. Por otra parte, si en el Chagas agudo hay compromiso hepático, queda la posibilidad de una hepatitis aguda de ese origen, o virósica instaurada sobre un hígado previamente comprometido. De todos modos no sé si se van a ver todas estas cosas. Por último, cabe mencionar la posibilidad de que se encuentren signos de sepsis, y una de las fuentes, además del intestino en esta enferma inmunocomprometida, es el aparato genital. Uno de los aspectos más curiosamente bien descriptos en la historia es la presencia de una probable candidiasis vaginal. Es muy probable, por último, que presente edema pulmonar, pues tenía una cardiopatía de base y estaba sobrehidratada...

Dr. E. Bullorsky: El linfoma maligno de tipo Burkitt, como dijo el Dr. Gagliardi, ha sido descripto en forma endémica en el Africa tropical; y en contrapartida al linfoma africano se ha descripto el así llamado linfoma americano, que es una denominación errónea, porque ha sido descripto en todo el mundo. Quizás lo correcto, de acuerdo a la evolución clínica distinta, sería hablar de linfoma endémico que se da solamente en Africa, y linfoma no endémico. Desde el punto de vista histológico no hay diferencias entre el linfoma endémico y el no endémico, caracterizados por una proliferación linfoblástica de linfocitos inmaduros con nucléolo bien prominente y, entre éstos, áreas de macrófagos con fagocitosis y la presencia de mitosis abundantes. Este aspecto monomorfo con áreas blancas dado por los macrófagos es lo que se ha descripto como imagen de "cielo estrellado" típica de este tumor.

La edad promedio para el linfoma de Burkitt, tanto en Africa como fuera de ella, es de 10 años, con un rango que va desde 2 años hasta 45 años, y hay un solo caso descripto en la literatura de más de 60 años. Por lo que este caso es excepcional. Desde el punto de vista del cuadro clínico, existen diferencias entre el Burkitt americano y el Burkitt endémico; en el primero, es menor la incidencia de infiltración ósea y del SNC, mayor infiltración de médula ósea e igual incidencia de tumores abdominales. Otro aspecto que no ha sido mencionado es que cuando el Burkitt tiene grandes masas abdominales, presenta también infiltración de las placas de Peyer de la pared intestinal, y esto puede explicar la sintomatología digestiva que presentó esta enferma. El grupo del Instituto Nacional de la Salud en EE.UU. ha presentado su casuística después de 15 años en el tratamiento de 120 pacientes con linfoma de

Burkitt, y en esta experiencia el Burkitt no endémico tendría dos factores pronósticos muy importantes. Uno es la edad: los pacientes fuera del rango de edad descripto para el Burkitt tienen mal pronóstico, y esta paciente sobrepasaba con creces el rango descripto. En segundo lugar, el estadío clínico del tumor: el grupo americano divide el estadío en cuatro tipos: A, B, C y D. A es localización extraabdominal única; B, extraabdominal múltiple; C, intraabdominal única, y D, intraabdominal más varias extraabdominales [1]. Esta paciente tenía varios tumores abdominales palpables, y ganglios axilares y cervicales, lo que ubica a esta enferma en un estadío D, que tiene sobrevida acortada. Otro aspecto importante, es la relación del linfoma de Burkitt respecto al virus de Epstein-Barr (EB)[2]. La célula que prolifera en este tumor es el linfocito B [3]. Desde tiempo atrás se sabe que los linfocitos B, entre otras características, son las únicas células del organismo que tienen receptores específicos de membrana para el virus del EB. Hay trabajos experimentales donde se hace cultivo de linfocitos B y si a ese medio se agrega concentrado de virus EB, se ve que los linfocitos proliferan. Por otro lado, la mayoría de la población mundial es portadora del virus de EB y en algún momento de su vida han tenido algún tipo de infección subclínica. Si esos mismos linfocitos que se cultivan adicionados con virus EB se inyectan a animales inmunosuprimidos, estos animales son capaces de desarrollar neoplasias del tipo B. Y digo esto por lo siguiente: tanto en la mononucleosis infecciosa, como en el linfoma de Burkitt africano se ha descripto una íntima asociación con el virus EB. ¿Por qué razón algunos individuos hacen una mononucleosis infecciosa y otros hacen un linfoma? Aparentemente la mononucleosis infecciosa, de acuerdo a esto, sería una proliferación de linfocitos B que intentaría ser tumoral, pero frenada por linfocitos del tipo *killer* y del tipo supresores. En cambio la proliferación de linfocitos B en el linfoma de Burkitt no se vería frenada, por lo que se desarrollaría el tumor. Y hay otra cosa que me parece importante, y por eso hablo de neoplasia clonal, y es el hecho de que hay estudios cromosómicos de linfocitos B provenientes de individuos normales infectados en algún momento con virus EB, de individuos con mononucleosis infecciosa y de individuos con linfoma de Burkitt. Y se ve que algunos linfomas de Burkitt tienen una anomalía cromosómica característica que es una translocación del cromosoma 14 al 8 que no tienen los otros grupos. Eso sería muy semejante en lo que se describe en la leucemia mieloide crónica para el cromosoma Filadelfia, por lo cual es probable que la proliferación de linfocitos B en este grupo sea una proliferación clonal. El otro hecho que creo que es importante, que hace a todas las complicaciones del tratamiento, es la cinética celular. El linfoma de Burkitt es prácticamente la única neoplasia hematológica en la cual las células tienen una multiplicación de tipo logarítmica con una vida media de 66 horas. Son las células que más rápidamente proliferan. Y cuando uno hace el corte histológico, en la impronta de estos ganglios se ve gran cantidad de mitosis. ¿Por qué hago hincapié en esto? Porque en realidad esta enferma, que de todas maneras hubiera fallecido rápidamente por su neoplasia hematológica, creo que muere a consecuencia del tratamiento a pesar de la dosis de quimioterapia al medio, o al tercio que le fue administrada. En este momento existen cada vez más trabajos en la literatura respecto de un cuadro que es importante tenerlo en cuenta, que es llamado de *lisis tumoral rápida* y sus consecuencias. Hay determinadas neoplasias, en especial las hematológicas como el linfoma de Burkitt fundamentalmente o algunas leucemias linfoblásticas, de alta sensibilidad a la quimioterapia que después de la misma hacen cambios metabólicos y renales tan graves por lisis rápida de

— — — —

1. Ziegler JL: Treatment results of 54 American patients with Burkitt lymphoma are similar to the African experience. *New Engl J Med* 295: 685, 1976.

2. Klein G: The Epstein-Barr virus and neoplasia. *New Engl J Med* 293: 1353, 1975.

3. Mann RG, Jaffe ES, Braylan RC et al: Non endemic Burkitt's lymphoma: A B cell tumor related to germinal centers. *New Engl J Med* 297: 75, 1977.

tantas células, que pueden llevar al individuo a la muerte. Yo creo que esta enferma ha hecho una forma muy particular de lisis tumoral rápida. Como dijo el Dr. Gagliardi –coincido con él–, lo más característico en la lisis tumoral rápida es la hiperuricemia y la hiperkalemia –esta última lleva a los individuos a la muerte por arritmia cardíaca–[4]. Sin embargo, en lisis tumoral rápida se han descripto otras manifestaciones que creo que algunas de ellas la ha tenido esta enferma. He encontrado descripto un solo caso de coma hepático por lisis tumoral rápida[5]. Hay descriptas amplias complicaciones renales, tipo hipocalcemia, hipercalcemia en algunos casos, pero lo común es hipocalcemia, hipofosforemia, acidosis tubular renal y aun síndrome de Fanconi[6, 7]. La lisis tumoral rápida, en el linfoma de Burkitt, es tan grave que en la experiencia americana hay niños que son llevados a la quimioterapia con una cánula de Scribner puesta y se sabe que a esos niños, post-quimioterapia, en los 3 primeros días, se les hace hemodiálisis continua para evitar la muerte por hipercalemia y por uremia. Con respecto a la causa de muerte y qué es lo que yo esperaría encontrar en la autopsia, en primer lugar creo que desarrolla una rápida agranulocitosis; por lo tanto, esperaría encontrar una hipoplasia medular severa en médula ósea. En segundo lugar, como consecuencia de esa agranulocitosis, creo que la enferma ha injertado una sepsis, y en algún momento de la evolución se describe tanto la presencia de moniliasis vaginal como de intertrigo micótico, por lo cual una de las posibilidades a tener en cuenta es que esta enferma haya injertado una moniliasis sistémica. Con respecto al íleo, creo que se desarrolla post-tratamiento, no por la complicación chagásica; pienso que esta enferma ha hecho necrosis de placas de Peyer de pared intestinal infiltradas por el tumor y que esa necrosis de las placas de Peyer es lo que la ha llevado a la parálisis intestinal, hecho que está perfectamente descripto. Creo que la enferma muere en coma hepático, porque esto es claro, y que el episodio final ha sido un síndrome hepato-renal con uremia progresiva. En la necropsia pienso que vamos a encontrar algo muy llamativo, que son *masas necróticas*, en *especial en el abdomen*, como se describe clásicamente en la necrosis por lisis tumoral rápida en estos pacientes. En resumen, creo que en la necropsia vamos a encontrar estos datos: que la enferma fallece en coma hepático por invasión hepática difusa previa por el tumor, que el íleo está dado por necrosis de las placas de Peyer, también invadidas por el tumor, y que ha injertado una sepsis, y me pregunto si no es una sepsis moniliásica, con hipoplasia de la médula ósea y placas necróticas abdominales. Creo que el desarrollo de lisis tumoral rápida es algo imprevisible en otro linfoma, excepto en el linfoma de Burkitt. Creo que cuando uno trata un linfoma de Burkitt tiene que estar bien atento a esta complicación. El tratamiento estuvo justificado porque la enferma estaba en muy mal estado general, con diseminación difusa de su enfermedad hematológica, y pienso que de no haberla tratado de todos modos la muerte hubiera sobrevenido rápidamente.

Dr. J. Mercarian: La paciente tenía diagnóstivo serológico de enfermedad de Chagas y un electrocardiograma, mostrando bloqueo de rama derecha. Con estos elementos se plantea, por supuesto, el diagnóstico de miocardiopatía chagásica. Es difícil evaluar, en este caso, el compromiso miocárdico chagásico en una paciente con una evolución de 30 años de hipertensión arterial. En ningún momento de la evolución de su enfermedad aparece algún signo de insuficiencia cardíaca y no existen estudios complementarios para evaluar la función ventricular, pero por la radiografía de tórax, no parece existir

— — — —

4. Arsenan JC, Bagley CM, Anderson et al: Hyperkalemia, a sequel to chemotherapy of Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1: 10, 1973.
5. Appelbaum FR et al: Prolonged complete remission following high dose chemotherapy of Burkitt's lymphoma in relapse. *Cancer* 41: 1059, 1978.
6. Goldsweig HG et al: Proximal tubular dysfunction associated with Burkitt's lymphoma. *Cancer* 41: 568, 1978.
7. Brereton H et al: Hyperphosphatemia and hypocalcemia in Burkitt's lymphoma. Complications of chemotherapy. *Arch Int Med* 135: 307, 1975.

dilatación de cavidades, que es una característica de la miocardiopatía chagásica. Además, la presencia de un megacolon asociado a una cardiopatía chagásica, no es una situación habitual en nuestro medio, como sí lo es en la República de Chile, donde esta asociación se ve en el 80 % de los casos. Respecto del tratamiento con inmunosupresión, y considerando el Chagas, lo planteado por neurología respecto a una diseminación, en este caso sin tratamiento parasiticida concomitante, es una posibilidad a considerar, ya que hay casos comprobados. La arritmia que presentó la paciente es una extrasistolia ventricular aislada, y no ha presentado arritmias de mayor consideración. En el último electrocardiograma hay un ligero cambio de eje a la derecha, que podría plantear la posibilidad de un tromboembolismo pulmonar, aunque en ningún momento hay evidencias clínicas que hagan sospechar este diagnóstico. Por otro lado, la posibilidad de miocardiopatía chagásica con aneurisma, o seudoaneurisma de punta y de embolia a punto de partida de cavidades, tampoco parece probable.

Dr. J. B. Palmitano: Con respecto al compromiso digestivo en esta paciente es interesante hacer dos comentarios. Por un lado, era portadora de un megacolon, tenía trastornos electrocardiográficos similares a los descriptos en la enfermedad de Chagas, y una Machado Guerreiro. Con estos datos uno está autorizado a hacer el diagnóstico de enfermedad de Chagas con compromiso digestivo. Es conocido que el compromiso digestivo en dicha enfermedad aparece en la forma crónica y como una complicación tardía de la misma. Como ya se ha mencionado, está afectado el sistema nervioso intramural, que en realidad ocurre a lo largo de todo el tubo digestivo, con destrucción de las células ganglionares. Con respecto al grado de compromiso y cuáles son los órganos digestivos más frecuentemente afectados, es interesante mencionar una serie publicada por Earlam [8] en 1972 en Sudamérica, en donde se efectuaron autopsias en pacientes con enfermedad de Chagas. Sobre 400 autopsias se encontró: megacolon en 105 pacientes (25 %), megaesófago en 88 (20 %), dilataciones gástricas en 10 (4 %), y megaduodeno y megayeyuno en 8 y 1, respectivamente, frecuencia menor al 1 %. Es decir que, como es conocido, el compromiso más frecuente está dado en el colon y en el esófago. Con respecto a esta paciente, en realidad el megacolon no jugó un papel importante en la evolución, como es lo que suele ocurrir generalmente en los pacientes con enfermedad de Chagas, salvo algunas ocasiones en que pueden presentar algunos episodios abdominales agudos, como puede ser una volvulación con obstrucción intestinal aguda, o en los casos en que se puede presentar infartos intestinales secundarios a embolia mesentérica, que tiene como punto de partida a los trombos murales ubicados en cavidades cardíacas. Pero, aparentemente, esta paciente no presentó ninguno de estos cuadros. El otro punto interesante para comentar —al que ya se refirió el Dr. Gagliardi— es con respecto a la insuficiencia hepática. Esta paciente tenía compromiso hepático desde un principio, ya que tenía una fosfatasa alcalina elevada y un centellograma hepático con captación irregular del trazador y con zonas de hipocaptación. Posteriormente, y al final de la evolución, desarrolla hipocolesterolemia e hiperamoniemia con una bilirrubina de casi 6 mg %. Esto, indudablemente, es insuficiencia hepática, pero lo que nosotros no estamos tan seguros es que sea debido a compromiso parenquimatoso hepático por el tumor, es decir a un compromiso masivo por el tumor, ya que 20 días antes la paciente tenía un tiempo de Quick de 86 % lo cual en realidad logra una función hepática bastante conservada, y es muy difícil que se desarrolle un compromiso así masivo en 20 días. Aparte, tiene otras causas como para justificar la insuficiencia hepática, que haya sido desencadenada más bien por las alteraciones hemodinámicas, por el mal manejo de los líquidos que ha tenido, lo cual puede haber llevado a una hipoxia tisular, con una necrosis centrolobulillar, y ésto haya agravado o puesto

— — — —

8. Earlam J: Gastrointestinal aspects of Chagas disease. *Am J Dig Dis* 17: 559, 1972.

de manifiesto una insuficiencia hepática en un hígado previamente dañado.

Dr. S. Finkielman: El padecimiento de esta enferma merece algunos comentarios respecto a la etiología de la hipertensión, a la repercusión de la misma y, por fin, a la relación entre la hipertensión y la enfermedad de Chagas, que tiene un valor más que particular para esta paciente, un valor general. Respecto a la importancia de la hipertensión, en una mujer con una enfermedad de 30 años de evolución y con un accidente vascular cerebral, aparentemente 25 años antes, la hipertensión tiene que haber sido importante, aunque no haya tenido trascendencia en el cuadro final, tan importante como para provocar una hemiplejía cuyas secuelas se apreciaban 25 años después. Por lo tanto, es posible que sí tuviera una hipertensión relativamente severa y que, además, sea cierto lo que afirma el Dr. Benarroch, que el fondo de ojo no se observó detenidamente. ¿Qué diferencia hay entre un grado 1 o un grado 2 de retinopatía? Una diferencia muy grande: básicamente, la presencia de cruces arteriovenosos. A los cruces arteriovenosos hay que aprender a valorarlos y, a veces, un residente en sus comienzos no sabe hacerlo, y quizás no sepa encontrarlos tampoco pues, ocasionalmente, no se encuentran. Tengo pacientes que pienso que tienen arteriosclerosis retiniana y en los que en todos los cruces, las venas pasan por encima de las arterias, cosa que sucede con relativa frecuencia. Entonces, si uno no encuentra cruces arteriovenosos y sólo algún cambio arterial o venoso leve y no aprecia espasmo arterial, se trata de una retinopatía grado 1. Y bien, la paciente tiene una hipertensión grave con una retinopatía grado 1. Respecto a la etiología, existe una pielografía sugestiva de asimetría renal. No estoy seguro de que el riñón derecho sea más pequeño que el izquierdo, pero es posible que sí lo sea. En una mujer con bloqueo de rama derecha —lo que puede ser indicio de cardioesclerosis— la presencia de asimetría renal sugiere también la existencia de una arteriosclerosis aórtica o de arteria renal con hipertensión renovascular; lo que también está remarcado por el hecho de que la paciente pudo presentar un accidente cardíaco isquémico. Respecto a la relación entre la enfermedad de Chagas y la hipertensión, autores cordobeses —Palmero y Caeiro— [9] sostienen que los pacientes con serología chagásica positiva tienen presiones arteriales más bajas que la población. ¿Cómo demuestran esto? Toman pacientes con Chagas que consultan a sus servicios y los comparan con las estadísticas poblacionales, y encuentran que sus presiones arteriales son significativamente más bajas. ¿Se puede hacer tal afirmación procediendo de esta manera? Generalmente este tipo de afirmación se hace, pero su fundamento es débil. Primero, porque la edad de los pacientes portadores de Chagas a veces no coincide con la edad de la población que es representativa, de un rango de edades mucho más amplio; segundo, las estadísticas de población se hacen con registros casuales, mientras que los registros de presión arterial de los pacientes difícilmente puedan considerarse casuales: son pacientes que suelen conocer al médico y los registros se hacen en otras circunstancias. En un estudio de población, se pone un tensiómetro en la esquina de una calle o en la puerta de un negocio muy concurrido o en una escuela y se toma la presión a todo el que se acerca. Así, esta clase de comparaciones se presta mucho a los errores. Lo que es cierto, es que esta clase de comparaciones sirve para sugerir, en primera aproximación, un hecho que después debe ser verificado. La Dra. Mendivil, de Resistencia, con su grupo, publicó hace alrededor de un año, un estudio de las presiones arteriales de conscriptos de zona endémica, de los cuales —eran 400 sujetos— el 25 % tenía serología positiva chagásica, y encontró que no había diferencias significativas entre el grupo con serología chagásica y un grupo de la misma edad y procedencia sin serología chagásica; y seleccionando grupos, por ejemplo los que tenían alteraciones electrocardiográficas, o los que tenían signos físicos, se encontró que aquellos pacientes con serología chagásica y que te-

9. Palmero HA, Caeiro TF, Joba DJ: Efecto de la enfermedad de Chagas sobre la presión arterial. *Rev Arg Cardiol* 1: 333, 1948.

nían signos físicos positivos como soplos funcionales, eretismo cardíaco, o trastornos electrocardiográficos como bradicardia o taquicardia, o extrasistolia, esos tenían mayor presión arterial que los controles con serología negativa [10]. Aparentemente, todo lo contrario de lo que se refiere en los trabajos de Palmero y Caeiro. Estos estudios se confirmaron en grupos de mayor edad y no parece haber diferencias de presión arterial entre pacientes con serología positiva y pacientes con serología negativa bien comparados (observaciones no publicadas). Creo que una cosa similar sucedió en el sur de Brasil respecto al megacolon. La observación de megacolon y megaesófago en la enfermedad de Chagas se ha referido desde hace 50 años. Y curiosamente, en poblaciones en las cuales hay alta prevalencia de megacolon y megaesófago. Quizás el defecto máximo que adolecen todos los estudios de enfermedad chagásica es que no se controlan. Generalmente cuando se estudia una enfermedad no se buscan controles en la población sana, porque la enfermedad resalta obviamente contra el marco de la población sana. Así que nadie busca controles de gota; la gota se describió mucho antes de que el ácido úrico se conociera, y la enfermedad gotosa parecía muy recortada respecto a la normalidad. Lo mismo pasó con el sarampión, y lo mismo pasa con el accidente vascular cerebral. Si en una enfermedad se unen el megacolon, el bloqueo de rama derecha y la cardiomegalia, y todo eso en un marco serológico positivo, con una serología determinada, que es un estudio de laboratorio que da individualidad y fundamento etiológico, es muy fácil incurrir en el error de hacer una entidad en donde posiblemente la entidad no existe. Les voy a dar un ejemplo. La Dra. Mendivil estudió, además de la presión arterial, la incidencia de anormalidades electrocardiográficas en una población con alta incidencia de serología positiva [11]. En esa misma población de soldados se estudiaron las alteraciones electrocardiográficas y, sorpresivamente, no hubo diferencias significativas entre anormalidades electrocardiográficas de una población con serología positiva y una población con serología negativa. Por lo tanto, la alteración cardíaca no aparece como un hecho relevante a pesar de estar relacionada con una serología que le podía dar individualidad etiológica. Como los soldados actualmente tienen 18 años y se piensa que el tripanosoma tiene que actuar cierto tiempo (a pesar de que los soldados estaban expuestos desde su infancia a la vinchuca) se decidió estudiar en la misma población a un grupo no arterioscleroso de pacientes de más edad, que tuviera mayor tiempo de evolución (trabajo no publicado). Se tomó un grupo de 20 a 42 años para estudiar la incidencia de anomalías electrocardiográficas. Y se encontró, otra vez, que no hay diferencias entre anomalías electrocardiográficas de la población serológicamente positiva y la población con serología negativa. Lo que sí llama la atención, es la alta incidencia de anomalías electrocardiográficas en pacientes de menos de 40 años en Chaco y en Formosa. Mientras que en los aspirantes a ingresar en las Fuerzas Armadas Norteamericanas y en los sujetos que están dentro de las Fuerzas Armadas Norteamericanas, que se suponen sanos, se encuentran alteraciones electrocardiográficas del orden del 5 % [12], en la población sana del Chaco y Formosa se encuentran hasta un 30 % de alteraciones electrocardiográficas. Lo cual implica que existe realmente un problema epidemiológico importante asociado con una cardiopatía. Pero como esta "cardiopatía" está presente tanto en los pacientes con serología positiva como negativa, se de-

— — — —

10. Mendivil GT, Schenone E, Princich S. Finkielman S, Duarte E, Bustamante A, Gorodner JO: La presión arterial en jóvenes de 18 años en un área endémica para la enfermedad de Chagas. *Medicina (Bs Aires)* 38: 611, 1978.

11. Mendivil GT, Schenone E, Princich J, Finkielman S, Bustamante A, Duarte E, Roldán L, Gorodner JO: Alteraciones electrocardiográficas en jóvenes con pruebas serológicas positivas para Chagas y residentes en área endémica. *Medicina (Bs Aires)* 39: 345, 1979.

12. Hiss RG, Lamb LE: Electrocardiographic findings in 122 043 individuals. *Circulation* 25: 947, 1962.

biera pensar que la etiología de esa cardiopatía es completamente distinta y que no tiene relación con el Chagas. Estos pacientes, o bien padecen enfermedades deficitarias o tienen enfermedades tóxicas, o infecciones u otra enfermedad indefinida que los hace propensos a una cardiopatía que nada tendría que ver con la vinchuca y el tripanosoma. Respecto a si la enfermedad chagásica cardíaca crónica existe o no, creo que no se pueda negar su existencia. La definición de una enfermedad no es sólo estadística. Lo que sí se puede negar es que esta cardiopatía tenga relevancia epidemiológica. Recientemente se premió una obra del Dr. Basso y col. respecto a la evolución de chagásicos en Mendoza. El siguió la evolución de unos 300 y tantos chagásicos durante algo así como 40 años. Y encontró, o afirma, que nadie se muere de cardiopatía chagásica crónica [13]. De acuerdo a los criterios que prevalecen, esta enferma viene a ser un modelo de texto para enfermedad de Chagas, y debiera tener la enfermedad de Chagas. Tiene megacolon, tiene bloqueo de rama derecha y tiene serología positiva. Tiene una encefalopatía en el curso de un tratamiento con inmunosupresores, lo cual también es posible en el Chagas, porque en los pacientes que tienen serología chagásica con parasitemia persistente –un alto porcentaje de ellos– la inmunosupresión puede provocarles una encefalopatía aguda. Pero se puede afirmar que no tiene una cardiopatía chagásica; ya lo dijo el Dr. Markarian, en presencia de hipertensión durante 30 años, posiblemente severa, no puede hacerse ese diagnóstico.

Discusión anatomopatológica

Dra. C. ALVAREZ: Primeramente revisaremos el ganglio cervical que dio origen al diagnóstico. Presenta una proliferación uniforme de células indiferenciadas con abundantes mitosis. Las células tienen núcleos levemente irregulares con nucléolo prominente y escaso citoplasma anfófilo. Entre ellas se observan numerosos macrófagos que le dan el clásico aspecto de "cielo estrellado". Es decir, que cumple con los requisitos que exige la O.M.S. para el diagnóstico de Linfoma Maligno Indiferenciado, tipo Burkitt (Fig. 1). En

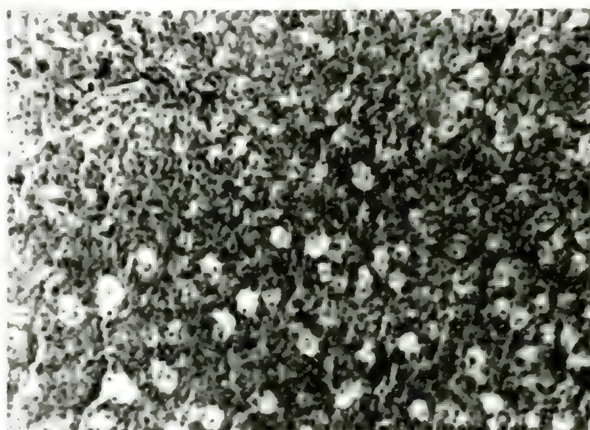


Fig. 1. — Ganglio linfático cervical: característico aspecto de "cielo estrellado".

la autopsia no se encontró compromiso ganglionar por el linfoma. Se disecaron solamente 4 ganglios pequeños lumboaórticos, que resultaron normales. Había, en cambio, dos grandes masas tumorales que medían 9 x 7 cm y pesaban 100 g cada una, y que reemplazaban ambas adrenales (Fig. 2). Ningún otro órgano estaba comprometido y la localización era exclusivamente en las adrenales. Además, a través de la vena suprarrenal derecha se extendía una trombosis tumoral a la vena cava inferior, que medía 9 cm de longitud. El linfoma de Burkitt, tipo americano, compromete órganos abdominales y con cierta tendencia a localizarse en órganos pares. Histológicamente, el tumor estaba totalmente necrótico, quedando algunos linfocitos viables en la periferia. Este tumor

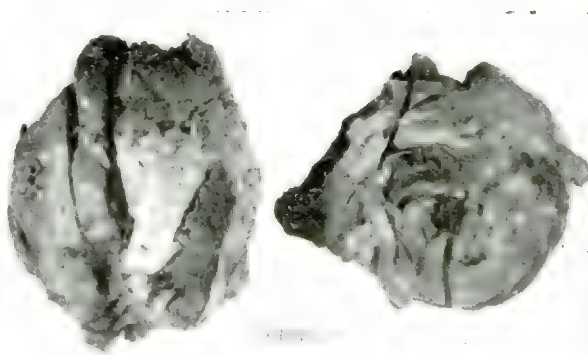


Fig. 2. — Infiltración linfomatosa de ambas adrenales.

— — — —

13. Basso G, Basso R, Bibiloni A: Investigación sobre la enfermedad de Chagas-Mazza. EUDEBA, Buenos Aires, 1978.

responde bien a la quimioterapia produciendo un cuadro de lisis tumoral total, que ya ha sido comentado anteriormente. La médula ósea no presentaba infiltración linfomatosa, ni tampoco linfocitosis; era una médula hipocelular. El hígado estaba moderadamente agrandado, pesaba 1850 g y tenía transformación grasa masiva tipo macrovacuolar. Los riñones tenían lesiones de nefroesclerosis benigna, encontrándose en el riñón derecho lesiones de pielonefritis aguda con abscesos de polinucleares en la médula. En el riñón izquierdo se encontró un lipoma cortical. Con respecto a la enfermedad de Chagas, la misma no pudo comprobarse. El corazón pesaba 360 g y sus medidas eran normales. Había moderada arterioesclerosis coronaria con una miocardiofibrosis difusa. Se estudió el nódulo sinusal y el nódulo auriculoventricular, encontrándose aumento de la fibrosis en los haces de conducción. La asociación con el megacolon es fortuita, ya que macroscópicamente todo el colon estaba dilatado, predominando la dilatación en el colon izquierdo. Histológicamente, los plexos nerviosos no mostraban alteraciones, se trataría de un megacolon idiopático adquirido. El cerebro pesaba 1000 g y no presentó lesiones significativas.

Diagnóstico anatomopatológico

Antecedente de Linfoma Maligno Difuso Indiferenciado, tipo Burkitt en ganglio cervical. B. Nº 23701.

1) *Infiltración linfomatosa difusa de ambas adrenales con lisis tumoral completa.*
   Trombosis tumoral de vena cava inferior.
   Hipoplasia de médula ósea. Transformación grasa masiva de hígado.
   Pielonefritis aguda de riñón derecho. Esofagitis aguda. Ulceraciones gástricas superficiales.
   Megacolon idiopático adquirido.
2) *Ateromatosis grave de aorta y ramas. Arterioesclerosis coronaria.*
   Nefroesclerosis benigna. Miocardiofibrosis difusa. Fibrosis de los haces de conducción.
3) *Lipoma cortical en riñón izquierdo.*

— — — —

Una pequeña célula equivocada
o una fibra gastada en su trabajo
y el aviador se equivoca de cielo,
el tenor se derrumba en un silbido,
al astrónomo se le pierde un planeta.

Pablo Neruda (1867-1916)
Oda al hígado

ARTICULO ESPECIAL

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 95-100 (1981)

HORMONAS RENALES

SISTEMAS KALIKREINA, KININA Y PROSTAGLANDINA

R. MARTIN, ELVIRA E. ARRIZURIETA DE MUCHNIK

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Según el concepto clásico, una hormona es una sustancia altamente específica segregada por un tejido, y que, transportada por la sangre, ejerce su acción en otros tejidos distantes. A medida que la investigación biológica ha ido ocupándose de la función a nivel celular, nuevas sustancias han sido individualizadas que no son transportadas por la sangre y que actúan a nivel local. La kalikreína renal (KR) y las prostaglandinas (PG) renales pertenecen muy probablemente a este último grupo.

Junto a las sustancias nombradas se engloban también bajo el nombre de hormonas renales la renina, la vitamina D (1,25-$(OH)_2$-D_3) y la eritropoyetina. La siguiente revisión, empero, se ocupará principalmente de los aspectos renales de la KR y de las PG, y del sistema renina-angiotensina (SRA) sólo cuando éste interaccione con las dos primeras. Es preciso también señalar que en estas páginas haremos hincapié sobre aquellos resultados que, aun sometidos a controversia, sirven para explicar algunas hipótesis de trabajo. No se tratarán entonces cuestiones metodológicas. En la selección de la inmensa literatura a nuestro alcance han influido, como siempre, las líneas de investigación de nuestro laboratorio. Por estas razones es importante avisar al lector que la supersimplificación que encontrará en algunos párrafos tiene un motivo mayormente didáctico y está sujeta a otros puntos de vista.

SISTEMA KALIKREÍNA-KININAS (SKK)

La historia del SKK comenzó en 1925 en Alemania con Frey y Kraut[7]. Estos investigadores observaron que la inyección endovenosa de orina a un perro anestesiado provocaba un descenso de la presión arterial. En la búsqueda del órgano productor de aquella hipotética substancia, descubrieron que el líquido contenido en un quiste pancreático humano también era capaz de disminuir la tensión arterial. La nueva substancia fue nombrada kalikreína, palabra derivada de *kallikreas*, que es el nombre griego del páncreas. Muchos años después Nustad y col.[17] demostraron que cortes de corteza renal sintetizaban kalikreína in vitro y Roblero y col.[18] observaron que el riñón aislado y perfundido con fluidos que no contenían kalikreína era capaz también de excretar kalikreína en la orina. Estos hechos demostraron la presencia de una KR. Es importante señalar que la KR se comporta en forma diferente a la kalikreína plasmática y en forma idéntica a la kalikreína urinaria (KU) cuando ambas son inhibidas con poroto de soya y/o anticuerpos correspondientes. Por estas razones la medida de KU refleja la producción de KR en el parénquima renal.

Recibido: 2-X-1980. Aceptado: 9-X-1980.

Dirección postal: Instituto de Investigaciones Médicas, Donato Alvarez 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina.

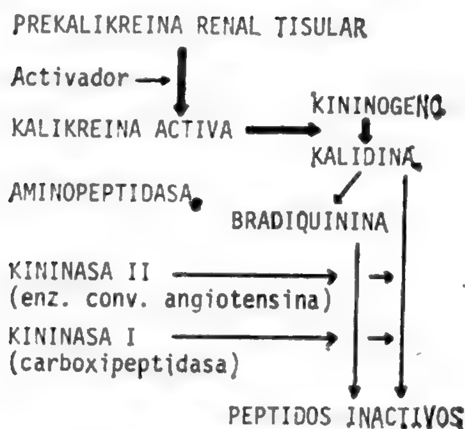


Figura 1

Como puede observarse en la Figura 1, la kalikreína es una enzima (PM 24 000-44 000) que existe en los tejidos como prekalikreína, la que necesita ser activada para actuar sobre un substrato, el kininógeno, para producir el decapéptido activo llamado kalidina. A su vez una aminopeptidasa libera un aminoácido de la kalidina y la transforma en bradiquinina. Ambos péptidos —la kalidina y la bradiquinina—, son por último inactivados por una carboxipeptidasa (kininasa I) y la enzima convertora de la angiotensina (kininasa II). Es importante destacar aquí la primera conexión entre los sistemas RA y KK: la misma enzima que inactiva a la bradiquinina y a la kalidina convierte la angiotensina I en angiotensina II. La kalikreína plasmática (PM 100 000) sólo actúa sobre el kininógeno de alto peso molecular y libera directamente bradiquinina.

1. *SKK y flujo sanguíneo renal (FSR)*

Los experimentos tendientes a esclarecer el rol fisiológico del SKK se han basado en observar los efectos que producen la administración o la inhibición de algunos de los componentes del sistema y en las asociaciones halladas entre estos componentes y otros fenómenos biológicos. Así, Barraclough y col.[2] demostraron en 1965 que la infusión de bradiquinina en la arteria renal de perro provocaba natriuresis, lo que hizo pensar a algunos investigadores que aquel péptido pudiera tratarse del factor natriurético postulado por de Wardener 4 años antes. Siguiendo esta línea de pensamiento Marin Grez y col.[12] efectuaron una sobrecarga salina en perros y encontraron un aumento de las kininas en la vena cava por encima de la desembocadura de las venas renales, fenómeno que estaba ausente cuando el animal era nefrectomizado. En nuestro laboratorio pudimos comprobar una correlación significativa entre excreción de KU (medida por su acción estereolítica sobre el substrato semisintético TAMe) y excreción urinaria de sodio ($U_{Na}xV$) en ratas sometidas a sobrecarga salina crónica y en grupos controles[1]. Pero esa correlación significativa no se mantenía cuando $U_{Na}xV$ era mayor de 250 μEq/100 g/d. Sin embargo, cuando KU se comparó con la excreción total de solutos ($U_{osm}xV$) en diferentes condiciones experimentales (ratas deshidratadas, con sobrecarga salina crónica y con administración crónica de furosemida) la correlación, además de ser estadísticamente significativa, se mantenía por encima de aquel valor de $U_{Na}xV$ (Fig. 2)[1] Estos hallazgos sugirieron que la activación del SKK podría estar relacionada con los eventos intrarrenales que tienen lugar para excretar solutos. Y como ha sido demostrado que el tratamiento con furosemida y la sobrecarga osmótica y acuosa aumentan el FSR, era probable que el SKK mediara el manejo intrarrenal de solutos a través de cambios en el FSR. Con esta hipótesis estudiamos tres grupos de ratas con dieta hiposódica, controles y con dieta hipersódica con el objeto de esta-

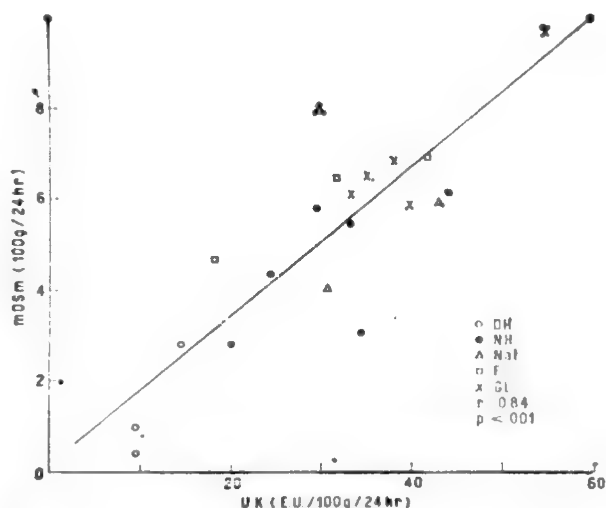


Fig. 2. — Excreción total de solutos y excreción de KU. Cada punto representa el promedio de un lote de 5 animales estudiados: DH, deshidratación; NH, normohidratación; Na, sobrecarga salina; F, furosemida; Gl or W, glucosa o agua.

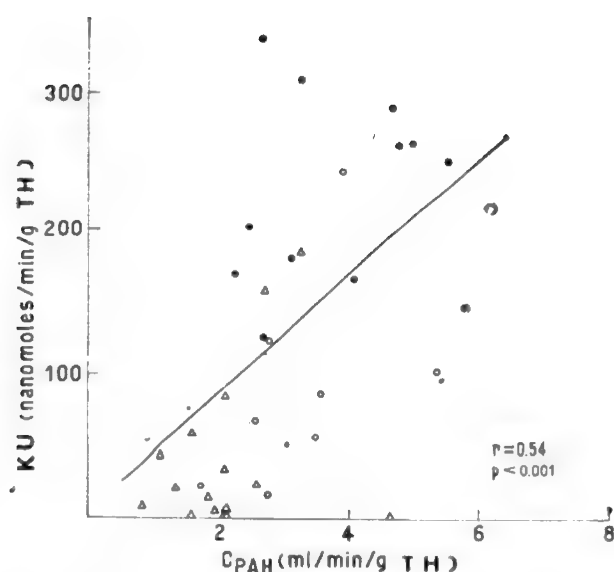


Fig. 3. — Excreción de KU y flujo plasmático renal en diferentes condiciones de ingesta de sodio: o, •, △, dieta normal, hiper e hiposódica.

blecer cambios en el FSR y observar el comportamiento de KU. Y así se observó una correlación significativa entre la excreción de KU y el FSR medido por el clearance de PAH (Fig. 3)[13]. Nasjletti y col.[16] efectuaron otro experimento dirigido a indagar el rol del sistema KK en condiciones fisiológicas basales. El compuesto denominado BPP 9 alfa inhibe la kininasa II y por este mecanismo inhibe la degradación de las kininas, aumentando por consiguiente sus efectos. Al inyectar BPP 9 alfa en la arteria renal en perros el FSR aumentó el 16 % y la variación de ese aumento se correlacionó con la variación de la excreción de kininas en la orina y con la variación del nivel de kininas en la vena renal.

Todas las evidencias señaladas hasta aquí sugieren que existiría un "tono" activo del SKK, con una constante producción de kininas intrarrenales, las cuales contribuirían a modular el FSR.

2. *SKK y excreción urinaria de sodio*

Como se dejó establecido arriba, el SKK ha sido postulado como natriurético. Sin embargo, existen otras evidencias que señalan un efecto contrario. Margolius y col.[11] encontraron un aumento en la excreción de KU en animales y en humanos, cuando ambos eran tratados con dietas hiposódicas. Por otro lado, la excreción de KU disminuía cuando sujetos normales con dietas fijas en sodio recibían espironolactona. Por último, aquellos investigadores comprobaron un aumento de la excreción de KU tanto en el hiperaldosteronismo primario como en el fenómeno de "escape" a la acción de los mineralocorticoides. Estos hallazgos sugirieron que la excreción de KU podría estar en relación directa con el nivel de actividad mineralocorticoidea a nivel del sitio donde actúan los mineralocorticoides, es decir, el túbulo distal. Existen también otras dos líneas de investigación que señalan una conexión entre KU y segmentos distales del nefrón. Una de ellas es la aportada por Scili y col.[19], quienes utilizando la técnica del *stop-flow* encontraron que KU —y también las kininas— se añadían en la orina en el túbulo distal. La otra es la señalada por Sealey y col.[20]. Estos autores observaron que la actividad renínica plasmática aumentaba hasta 10 veces en las muestras de plasma que habían sido conservadas a bajas temperaturas y sugirieron que una renina inactiva (prorrenina) se activaba con el frío. Posteriormente, los mismos investigadores comprobaron que la kalikreína era también un potente activador de la prorrenina, con una intensidad 50 veces mayor que la tripsina. Este fenómeno, junto al hecho de que la kalikreína se segrega en el nefrón distal, hizo postular la hipótesis de que la kalikreína fuera el activador fisiológico intrarrenal del SRA[20]; algunos hallazgos, como la correlación directa existente entre excreción de KU y proporción de renina activa en la circulación general apoyarían aquella interpretación.

Para finalizar con el SKK, es conveniente señalar dos hipótesis de trabajo, apoyadas en hechos experimentales evidentes. Así Carretero y col.[4] postulan (Fig. 4) que el kininógeno de bajo peso molecular filtraría y sería el substrato de la kalikreína en el segmento distal. Existe una observación clínica interesante en este sentido y es que un paciente con deficiencia congénita de kininógeno de bajo peso molecular no mostraba kininas en orina. El kininógeno filtrado sería transportado a lo largo del túbulo proximal, epitelio que contiene kininasas. Este último hecho fue demostrado al comprobar que la bradiquinina

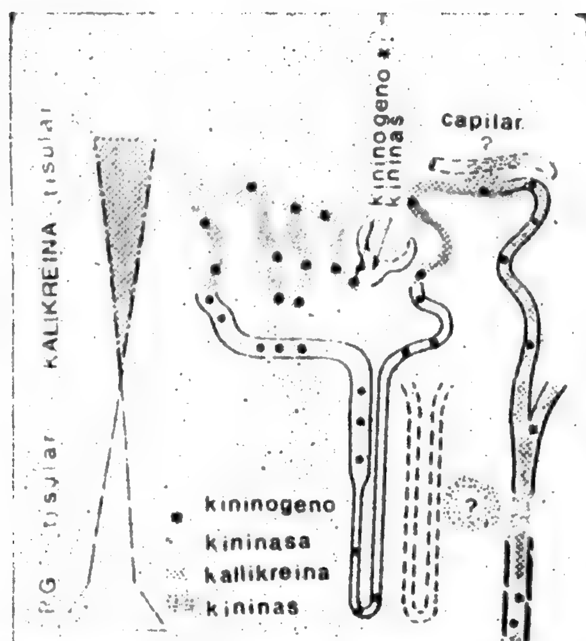


Fig. 4. — Localización del sistema kalikreína-kininas renal a lo largo del nefrón.

inyectada en el túbulo proximal no aparecería en orina, y sí aparecía cuando era inyectada en el túbulo distal [3]. Las kininas serían formadas en el túbulo distal y tendrían una acción vasodilatadora al difundir probablemente hacia el intersticio. También puede observarse en la Figura 4 la distribución "en espejo" de los sistemas KK y de las PG, aquél predominando en la corteza y éste en la médula renal. La otra hipótesis de trabajo es la postulada por Sealey et al. [20]. Estos investigadores interpretan la unión entre los sistemas KK y RA de la siguiente manera: la kalikreína produciría kininas y activaría la prorrenina simultáneamente. La liberación de dos enzimas de acciones opuestas —vasodilatadora y vasoconstrictora—, podría parecer paradojal y contraproducente. Sin embargo, los péptidos vasoactivos resultantes actuarían a distintos niveles; la angiotensina II produciría vasoconstricción sistémica y controlaría la tensión arterial, después de convertirse de angiotensina I en angiotensina II en su paso por el pulmón. Mientras que las kininas producirían vasodilatación intrarrenal y no sistémica, ya que la enzima convertora pulmonar las destruiría. De acuerdo a esta hipótesis este sistema dual trabajaría rápidamente para mantener una perfusión tisular renal normal mientras aumenta la presión arterial, siendo por lo tanto las kininas hormonas tisulares locales y la angiotensina II una hormona sistémica.

Sistema de las prostaglandinas (PG)

Von Euler descubrió en 1934 un principio vasoactivo en las glándulas seminales de la oveja que fue denominado prostaglandina. Este principio fue luego químicamente caracterizado y desdoblado en varias prostaglandinas. Las PG derivan de ácidos grasos que se encuentran como ésteres de fosfolípidos en las membranas celulares. La fosfolipasa A_2 libera el precursor, el ácido araquidónico y sobre éste actúa una ciclo-oxigenasa-peroxidasa —también unida a la membrana celular— y produce un endoperóxido. El endoperóxido es un compuesto altamente inestable y se transforma, por acción sucesiva de una isomerasa y de una reductasa, en la PG A_2, E_2 y F_{2alfa}. La transformación de PGE_2 en PGE_{2alfa} también tiene lugar a través de una FGE-9-ketoreductasa, estimulada por la kalikreína. Por último, estas tres prostaglandinas son luego inactivadas por un sistema de dehidrogenasas, también presentes en la membrana celular. Es importante enfatizar el hecho de que las PG se producen y se inactivan en el mismo sitio, lo que las sitúa en el mismo lugar que las kininas, es decir, hormonas tisulares locales.

A través de estudios bioquímicos e inmunológicos se ha demostrado actividad de síntesis de PG en estructuras vasculares, tubulares y células intersticiales de la médula renal principalmente y Williams y col. [23] demostraron con la técnica del *stop-flow* que las PG que se encuentran en orina se agregarían entre el túbulo proximal y el túbulo distal, es decir, el asa de Henle.

1. *PG y FSR*

Como lo demuestra la Figura 5, tomada de McGiff y Vane [14], la infusión en la arte-

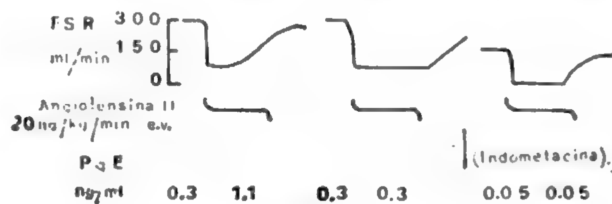


Figura 5

ria renal de angiotensina II, a la dosis de 20 ng/kg/min, produce una caída del FSR de 300 a menos de 150 ml/min. Pero el FSR se recupera parcialmente a pesar de continuar con aquella infusión. Coincidentemente la concentración de PGE_2 en la vena renal aumenta 4 veces. Por el contrario, toda vez que no se constataba una elevación de la PGE_2 en la vena renal (Fig. 5, centro), la angiotensina II ocasionaba una disminución sostenida del FSR. Finalmente (Fig. 5, derecha), si se inhibía la ciclooxigenasa-peroxidasa con indometacina, y por ende la síntesis de PG, el FSR caía por debajo del valor normal junto a una disminución de la concentración de PG en la vena renal de 6 veces por debajo de lo normal. Si luego de haber inducido esta caída basal del FSR se infundía angiotensina II, se observaba una caída posterior del FSR y sin recuperación del mismo. Estos estudios sugieren que el FSR basal está influenciado por un "tono basal" de secreción de PG y que la actividad del sistema presor se potencia por la disminución de la actividad prostaglandínica. Estudios clínicos [9] en pacientes con lupus eritematoso sistémico han demostrado también que el tratamiento con ibuprofen, inhibidor de la ciclooxigenasa, produce una disminución significativa del *clearance* de creatinina junto a una caída de la excreción urinaria de prostaglandina E, fenómeno probablemente debido a una disminución del FSR. Las interrelaciones descriptas entre el sistema de las PG y el SRA han llevado a investigar si las PG ejercen alguna influencia sobre la liberación de renina. Data y col. [5] idearon un experimento para anular estímulos conocidos de la secreción de renina. Así utilizaron el modelo de "riñón no filtrante" para evitar la influencia del fluido tubular sobre la mácula densa; y agregaron una adrenalectomía bilateral con denervación renal y una infusión continua de propanolol para bloquear los factores adrenérgicos y los receptores beta, respectivamente. En este modelo, la reducción de la presión de perfusión renal en un 50 % aumentó 4 veces la actividad renínica renal. Esta elevación fue abolida por el tratamiento previo con indometacina. Además, la infusión de ácido araquidónico aumentó también la actividad renínica plasmática de la vena renal. Estos datos indicarían que el sistema de las PG puede afectar el mecanismo renal de los baroreceptores para la liberación de renina, siendo esta interacción debida probablemente a productos de la ciclooxigenasa renal cortical, ya que en el modelo de "riñón no filtrante" las PG no pueden ser transportadas desde la médula renal hasta la corteza.

Otro aspecto interesante es la redistribución del FSR ocasionada por la inhibición del sistema de las PG. Así Stein y col. [10], usando el método de las esferas radiactivas, observaron una disminución del FSR total de 209 a 116 ml/min; pero mientras esa disminución fue del 25 % en la zona más periférica de la corteza, fue del 65 % en la corteza interna. Esto podría indicar que la síntesis y la liberación de las PG en la médula renal pueden llevar a una acumulación local en sitios receptores específicos en la circulación post-glomerular de los nefrones corticales más internos que son los que suplen la circulación a la zona medular renal. De esta manera se produciría una vasodilatación preferencial.

Estas influencias que las PG ejercen sobre el FSR no significan que desempeñen un rol en la autorregulación del mismo. Y dos grupos de investigadores han comprobado que la inhibición de las PG no suprime el fenómeno de autorregulación, aunque sí desplaza su curva ligeramente hacia la derecha.

2. *PG y excreción de agua y sodio*

Como en el caso de las kininas, ha sido demostrado que la infusión de PG y de ácido araquidónico producen un aumento de la diuresis y de la natriuresis [6]. Con el objeto de localizar el sitio de acción Gross y col. [8] estudiaron perros en diuresis acuosa y en deshidratación e infundieron en una arteria renal PGE_1 y PGA_1, tomando el riñón contralateral como control. Los resultados mostraron un aumento de la excreción de sodio y del clearance de agua libre ($C_{H2}O$) en diuresis acuosa y una disminución de la reabsorción de agua libre ($TC_{H2}O$) en deshidratación. No se comprobó alteración en la relación $C_{H2}O$ y volumen urinario en diuresis acuosa al

infundir PGE y PGA. Esto sugeriría que el efecto de las PG es primariamente el resultado de una disminución de la reabsorción del filtrado glomerular a nivel del túbulo proximal. Sin embargo, ha sido difícil en este y en otros experimentos dilucidar si la acción de las PG es a través de un efecto tubular directo o a través de alteraciones en el FSR, el cual aumenta constantemente con la infusión de aquéllas. Recientemente Stokes y col. [21] han podido demostrar una acción tubular. Estos autores encontraron una disminución del transporte neto de sodio desde el lumen hacia la membrana basolateral del túbulo colector cortical aislado y perfundido, bajo la acción de la PGE_2.

Es indudable que los tres sistemas hormonales —SRA, SKK y PG— actúan en conjunto para regular el FSR y la excreción de agua y electrolitos. Sin embargo, como se ha querido dejar establecido en esta revisión, el conocimiento es todavía fragmentario y no puede ser sometido a una síntesis satisfactoria. Estudios en segmentos aislados del nefrón y en estados patológicos traerán probablemente nuevos elementos integrativos en el futuro.

Bibliografía

1. Arrizurieta de Muchnik EE, Nesse A, Martin R: Urinary kallikrein and its relation with changes in body fluid compartments and urinary composition. *Medicina (Bs Aires)* 38: 629, 1978.
2. Barraclough MA, Mills IH: Effect of bradykinin on renal function. *Clin Sci* 28: 69, 1965.
3. Carone FA, Pullman TN, Oparil S, Nakamura S: Micropuncture evidence of rapid hydrolysis of bradykinin by rat proximal tubule. *Am J Physiol* 230: 1420, 1976.
4. Carretero OA, Scicli AG: The renal kallikrein-kinin system in human and experimental hypertension. *Klin Wochenschr* 56, Suppl I: 113, 1978.
5. Data JL, Gerber JG, Crump WJ, Frohlich JC, Hollifield JW, Nies AS: The prostaglandin system. A role in canine baroreceptor control of renin release. *Circ Res* 42: 454, 1978.
6. Dunn MJ, Hood VL: Prostaglandins and the kidney. *Am J Physiol* 233: F-169, 1977.
7. Frey EK, Kraut H: Ueber einen von der Niere ausgeschiedenen, die Herztaetigkeit anregenden Stoff. *Ztschr f physiol Chem* 157: 32, 1926.
8. Gross JB, Bartter FC: Effects of prostaglandins E, A, and F_{2alfa} on renal handling of salt and water. *Am J Physiol* 225: 218, 1973.
9. Kimberly RP, Bowden RE, Keiser HR, Plotz PH: Reduction of renal function by newer nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 64: 804, 1978.
10. Kirschenbaum MA, White N, Stein JH, Ferris TF: Redistribution of renal cortical blood flow during inhibition of prostaglandin synthesis. *Am J Physiol* 227: 801, 1974.
11. Margolius HS, Horwitz D, Pisano JJ, Keiser HR: Urinary kallikrein excretion in hypertensive man. Relationships to sodium intake and sodium retaining steroids. *Circ Res* 35: 820, 1974 b|
12. Marin Grez M, Cottone MP, Carretero O: Evidence for an involvement of kinins in regulation of sodium excretion. *Am J Physiol* 223: 794, 1972.
13. Martin R, Nesse A, Arrizurieta de Muchnik EE: Urinary kallikrein excretion, renal kallikrein content and renal plasma flow in the rat. *Medicina (Bs Aires)* 39: 467, 1979.
14. McGiff JC, Vane JR: Prostaglandins and the regulation of blood pressure. *Kidney Internat* 8: S-262, 1975.
15. McNay JL: Pharmacology of the renal circulation. *Am J Med* 62: 507, 1977.
16. Nasjletti A, Colina-Chourio J, McGiff JC: Disappearance of bradykinin in the renal circulation of dogs: effects of kininase inhibition. *Circ Res* 37: 59, 1975.
17. Nustad K, Vaaje K, Pierce JV: Synthesis of kallikreins by rat kidney slices. *Brit J Pharmacol* 53: 229, 1975.
18. Roblero J, Croxatto H, García R, Corthorn J, De Vito E: Kallikrein-like activity in perfusates and urine of isolated rat kidneys. *Am J Physiol* 231: 1383, 1976.
19. Scicli AG, Carretero OA, Hampton A, Cortes P, Oza NB: Site of kininogenase secretion in the dog nephron. *Am J Physiol* 230: 533, 1976.
20. Sealey JE, Atlas SA, Laragh JH: Linking the kallikrein and renin systems via activation of inactive renin. New data and a hypothesis. *Am J Med* 65: 994, 1978.
21. Stokes JB, Kokko JP: Inhibition of sodium transport by prostaglandin E_2 across the isolated, perfused rabbit collecting tubule. *J Clin Invest* 59: 1099, 1977.
22. Weber PC, Siess W, Scherer B: Vaskulare, thrombozytaere und renale Prostaglandine. *Klin Wochenschr* 57: 425, 1979.
23. Williams WM, Froehlich JC, Nies AS, Oates JA: Urinary prostaglandins: site of entry into renal tubular fluid. *Kidney Internat* 11: 256, 1977.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: (101-106 (1981)

DEVOCION A LA CAUSA DE LA SALUD: FRED LOWER SOPER

RAUL F. VACCAREZZA

Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

En la "Introducción" de su obra póstuma, "Andanzas por el Mundo de la Salud" * Fred Lowe Soper indica que no es una autobiografía; en realidad se trata de las Memorias del insigne sanitarista internacional empeñado en el desarrollo de la medicina preventiva y en los programas de erradicación de enfermedades transmisibles. Para su redacción el autor contó con el apoyo del "Diario" que compuso desde los comienzos de su vida profesional, del cual se transcriben diversos pasajes.

Estimo que la personalidad de Soper, por su trascendente y amplia actuación en el campo de la salud pública, despierta suficiente interés para que breves referencias biográficas no desentonen en el comentario de su último libro.

Fred Lowe Soper (1893-1977) nació en Hutchinson, pequeño pueblo del Estado de Kansas (EE UU), descendiente de ingleses por el padre e irlandeses por la madre. Lowe corresponde al apellido también inglés de la abuela paterna.

* *Andanzas por el Mundo de la Salud. Memorias de Fred Lowe Soper.* Editado por John Duffy. Publicación científica de la Organización Panamericana de la Salud. Versión castellana del original en inglés: *Ventures in the World Health*, preparada por el Servicio de Publicaciones y Documentación de la OPS/OMS. México, D.F., 1980, 387 págs.

— — — —

Recibido: 30-X-1980. Aceptado: 11-XI-1980.

Dirección postal: Academia Nacional de Medicina, Las Heras 3092, 1425 Buenos Aires, Argentina.

Graduado de médico en el Rush Medical College de la Universidad de Chicago, en 1918. Anteriormente había realizado cursos de licenciatura en varias disciplinas básicas en la Universidad de Kansas. En 1919 emprende la carrera especializada a la que debía consagrar definitivamente sus afanes médicos, al ingresar a la Fundación Rockefeller contratado por el término de tres años en la que fuera luego denominada División de Sanidad Internacional.

La Fundación Rockefeller (FR) creada en 1913, era una institución operativa en la administración de la salud pública internacional, en tanto que los estudios científicos competían al Instituto Rockefeller de Investigación Médica. No obstante el recelo y hasta la hostilidad que la FR despertaba entonces en países o ámbitos latinoamericanos al participar o dirigir ciertas actividades sanitarias, pronto sobraron pruebas demostrativas de su finalidad esencialmente filantrópica y humanitaria, libre de propósitos políticos, confesionales o comerciales.

Anquilostomiasis

El primer destino que le fue señalado al Dr. Soper fue el Nordeste de Brasil, con asiento en Recife, para combatir la endemia anquilostomiásica. Previamente había realizado un curso intensivo de parasitología en Baltimore, en la Universidad John Hopkins. En ese momento contrajo enlace, unión feliz que perduró hasta la muerte de la esposa en 1972. Permaneció un año y medio (1920-1921) en el NE brasileño

y luego le fue confiada igual misión en Rio Grande do Sul, con sede en Porto Alegre (1921-1922) a cuyo término retornó a Estados Unidos para cursar estudios superiores en la Universidad John Hopkins (1922-1923), de donde egresó con el grado de licenciado en Salud Pública. Al reanudar sus funciones es enviado al Paraguay (1923-1927) con el mismo cometido sanitario cumplido en Brasil.

El programa de FR en la lucha contra la anquilostomiasis perseguía la erradicación de la verminosis por el tratamiento sistemático de las personas infectadas y por su prevención mediante la construcción de retretes domiciliarios y el recomendado uso de calzado. En ciertos lugares del Brasil densamente parasitados el tratamiento —sobre todo con aceite de quenopodio en aquel entonces— fue aplicado masivamente a toda la comunidad, sin control parasitológico previo. En cambio, en el Paraguay, donde se recurrió al tetracloruro de carbono y luego al tetracloretileno, de menor toxicidad, se requirió la confirmación coprológica previa.

Respecto a la distribución geográfica de las dos especies patógenas para el hombre, se recuerda que el hábitat del *Ankylostoma duodenale* corresponde principalmente a Europa y Asia y que el denominado *Necator americanus* (Stiles, 1902), es oriundo del Africa Central, siendo atribuida su difusión en nuestro continente al tráfico de esclavos negros. En el Brasil se ha observado que el 99 % aproximadamente de estos vermes pertenecían al género *Necator*, mientras que Soper en el Paraguay comprobó una notable diferencia entre la población situada al este del río epónimo, con 93 % de *Necator*, y los aborígenes del Chaco Paraguayo, con una relación exactamente inversa: 93 % de *A. duodenale* y 7 % de *N. americanus*. Esta última comprobación, que sugiere la distinta procedencia de los habitantes de esas dos regiones coincide con lo registrado por Salvador Mazza[4] en indígenas del norte de Salta y Jujuy.

Fiebre amarilla

Como existía en la FR el propósito de abandonar la campaña contra la anquilostomiasis, en julio de 1927 el Dr. Soper fue trasladado a Río de Janeiro en calidad de jefe de la Oficina Regional, comienzo de una nueva etapa sanitaria que a poco debió centrarse en la erradicación de la fiebre amarilla (FA). En 1923, después de reiterados ofrecimientos de la FR para colaborar en la lucha contra esa enfermedad, se arribó, finalmente, a un acuerdo que disponía que las actividades antiamarílicas serían llevadas a cabo por el Gobierno Federal del Brasil por intermedio de una Comisión especial integrada por dos dirigentes de la Sanidad y dos representantes de la FR. En 1927 al regresar el Dr. Soper al Brasil la endemia se hallaba en marcada declinación; dos años antes se habían notificado sólo tres casos correspondientes al norte del país, se admitía la próxima y total desaparición de la enfermedad y permanecían únicamente en funciones los servicios del área nordeste. En este clima optimista, meses después, en mayo de 1928 estalla en la ciudad de Río de Janeiro un intenso brote epidémico que se extiende al Estado homónimo y a otros del N y del NE, epidemia que con variaciones estacionales de remisión y recrudecimiento subsistió en aquella ciudad durante 16 meses, manteniéndose en actividad hasta 1931 en ciertos lugares de los Estados de Río de Janeiro y Minas Geraes.

La reinfección de Río, después de veinte años de inexistencia de FA, sin ninguna fuente manifiesta del virus, y los resultados iniciales desalentadores de la lucha antivectorial demostraban que el problema epidemiológico era más complejo de lo supuesto y reclamaba para su erradicación nuevos planes con tecnología más eficaz. Esta evidencia condujo a la anulación del acuerdo de 1923 con la FR, substituido en 1929 por la creación de un Servicio Especial de FA en el Departamento Nacional de Salud Pública constituido por dos secciones: 1) la del Norte (llamada Servicio Cooperativo de FA) administrada por la Fundación, y 2) la del Sur, a cargo del D.N. de S.P. Los resultados cosechados condujeron a que el área controlada por el Servicio Cooperativo se extendiera rápidamente y en 1930 abarcaba ya todo el país, con excepción de la ciudad de Río de Janeiro, que luego fue igualmente incorporada. En 1932 habíase logrado la amalgama general de las actividades antiamarílicas

1. S. Mazza, *Prensa Méd Arg* 14: 49, 1927.

bajo la inspección general del Dr. Soper. Esta situación perduró hasta 1940.

La profilaxis de la FA comprendía la erradicación del *Aedes aegypti* sobre todo por la lucha antilarvaria, la administración vacuna antiamarilla a las personas receptivas (a partir de 1937), el examen histopatológico del hígado de todos los fallecidos por procesos febriles de una duración menor de diez días, práctica facilitada por el empleo del viscerótomo. La confirmación de la enfermedad se sustentaba en la prueba de neutralización, el aislamiento del virus amarílico en monos *Rhesus* y particularmente el reconocimiento de las lesiones hepáticas características descriptas por H. da Rocha Lima en 1912, cuya importancia pudo ser debidamente apreciada en la epidemia de 1928. En ese año, en conocimiento de FR que se había aislado en Africa el virus de la FA, instaló en Salvador (Bahía) un laboratorio especial para los estudios e investigaciones correspondientes.

A partir de 1928 habían surgido diversas circunstancias imprevistas que modificaron la epidemiología de la FA: la reinfección de Río de Janeiro y la vasta difusión territorial del mal, la aparición de FA en Venezuela, Bolivia y Brasil, independientes entre sí y sin relación con otros focos conocidos de infección y, particularmente, el hallazgo de casos en Brasil, Bolivia y Colombia sin presencia de *Aedes aegypti.* En la IX Conferencia Sanitaria Panamericana que tuvo lugar en Buenos Aires en 1934, Soper expuso todos estos hechos, señaló que en ese momento los focos existentes correspondían a medios rurales, con o sin presencia de *A. aegypti,* atento a lo cual debía admitirse la intervención de otros vectores y la posible existencia de especies animales reservorios de virus. De acuerdo con estos nuevos conocimientos y con recientes comprobaciones fue preparado el informe de la Comisión de FA, aprobado por la asamblea. Quedó oficialmente establecida la existencia de la FA selvática, así designada por Soper en sus últimos trabajos. Identificáronse, por lo tanto, dos formas epidemiológicas de FA, dependientes del mismo virus, pero que difieren por sus vectores y huéspedes habituales: 1) la forma urbana, transmitida por el *Aedes aegypti* al hombre, y 2) la forma selvática, zoonosis que afecta a diversas especies de monos, actuando como vectores mosquitos pertenecientes al género *Haemagogus* y que constituye una amenaza permanente de infección humana en poblaciones libres o liberadas del flagelo. Desde 1934 a 1972 se han producido varias invasiones de FA procedentes de las selvas amazónicas, que han descendido a lo largo de las cuencas del Paraguay y del Paraná y alcanzado a veces la zona fronteriza del Nordeste argentino. En 1940 el Servicio Cooperativo transformóse en dos nuevas secciones: 1) el Servicio Nacional de FA, encargado del programa operativo en todo el país, y 2) el Servicio Especial para la FA, sostenido conjuntamente por el gobierno de Brasil y la FR y al que se encomendaba la preparación de vacunas, el examen histopatológico de muestras hepáticas, las pruebas de neutralización y el estudio acerca de los posibles vectores y huéspedes de la FA selvática.

Asegurada la prevención de la FA en Brasil y la posible erradicación del *A. aegyti,* la FR, en 1948, se retiró de la beneficiosa tarea cumplida durante veinticinco años.

Tifus exantemático

Con motivo de la participipoción de Estados Unidos en la Segunda Guerra Mundial, Soper, representante de la FR en América del Sur, debió trasladarse en septiembre de 1942 al N de Africa, como misionario de dicha institución para combatir el tifus exantemático que afectaba a los ejércitos de los Aliados que operaban en ese frente. Instalado primeramente en Egipto no obstante haberse aplicado varias inyecciones de vacuna antitífica, a los pocos meses contrajo la enfermedad, de la que logró recuperarse.

En la lucha contra el piojo transmisor se había reemplazado el método antiguo de la desinfección de la ropa al vapor de agua por el espolvoreo de las prendas de vestir con polvos pediculicidas. Durante su estada ulterior en Argelia, por sugerencia del Dr. Edmond Sergent, Director del Instituto Pasteur de Argel, ensayan el espolvoreo de los sujetos vestidos para no tener que vencer la resistencia de las mujeres árabes a desnudarse, y adoptan el procedimiento por sus excelentes resultados. Al comienzo emplean AL-63 y MYL

y posteriormente de preferencia DDT por su fuerte y prolongada acción residual, susceptible de prolongarse a veces durante semanas. Con dicho procedimiento se facilitan considerablemente las campañas de despioje en gran escala.

Militarizado con el grado de teniente coronel en el Ejército de EE UU, Soper es enviado a fines de 1943 a Nápoles, cuya población era diezmada por el tifus. En las primeras semanas chocó con increíbles dificultades de orden administrativo y jurisdiccional entre civiles y militares, entre las mismas fuerzas aliadas y aun entre distintas organizaciones de estas últimas, surgidas a pesar del estado de guerra y del mortífero azote epidémico. Vencidos finalmente estos lamentables obstáculos pudo verificarse que el espolvoreo con DDT de las personas vestidas convierte al tifus exantemático en una de las enfermedades transmisibles de más fácil control.

La demostrativa experiencia de Nápoles fue confirmada al aplicarse igual programa en otros lugares de Europa durante el período terminal de la guerra y luego en las prisiones y campos de concentración.

Paludismo

En el Brasil, primero, y posteriormente en Egipto e Italia, Soper tuvo oportunidad de intervenir o colaborar en la lucha contra el paludismo, siempre con vistas a la erradicación del correspondiente agente vector y a la consecutiva desaparición de la incidencia de la enfermedad. Con este fin recurrió principalmente al empleo de larvicidas (verde de París) y accesoriamente al rociamiento de las viviendas con insecticidas (pelitre al comienzo y DDT en Italia, 1944).

Una situación especial, de suma gravedad, se planteó con la invasión del Nordeste brasileño por el *Anopheles gambiae*, vector de la terciaria maligna, especie autóctona del Africa tropical que en 1930 fue identificado en Natal, transportada seguramente por el servicio de correo aéreo entonces existente. Las medidas de prevención adoptadas fueron, sin duda, tardías o parciales, pues si en los años subsiguientes el exótico *Anopheles* había desaparecido de aquella ciudad, permanecía activo, en cambio, en otras poblaciones del Estado do Rio Grande do N y después en el de Ceará, donde en 1938 se desató una severa epidemia con millares de muertos. Para solucionar este grave problema de salud se creó en 1939 el Servicio de malaria del Nordeste, confiando la administración del programa de lucha a la FR, bajo la dirección del Dr. Soper. La actividad de este Servicio se tradujo en el rápido control de la epidemia y en la erradicación del temible vector en el curso del año 1940, que pudo confirmarse ulteriormente.

En 1943, al llegar Soper a El Cairo para combatir el tifus, se enteró que el mismo fenómeno invasor del *Anopheles gambiae* se había operado en Egipto desde el año anterior, procedente del Sudán. La campaña que llevó a cabo entonces la FR bajo sus directivas obtuvo el mismo éxito registrado en Brasil: la total erradicación del mosquito transmisor.

Por último, durante su estada en Italia cooperó en el estudio de la endemia palustre y en la planificación del programa de erradicación del *Anopheles labranchiae*, compromiso que contrajo la FR en Cerdeña.

En mayo de 1946 Soper se retira de Italia y seguidamente asume en El Cairo la dirección de la Oficina Regional de la FR en Africa y Mediano Oriente, de reciente creación.

Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)

En la XII Conferencia Sanitaria Panamericana, celebrada en Caracas en enero de 1947, el Dr. Soper fue elegido Director de OSP, en reemplazo del Dr. Hugh S. Cumming, quien la había desempeñado honorariamente durante largos años. Elección impuesta por los sobresalientes antecedentes del candidato y por los nuevos cometidos que desarrollaría la entidad. En ese momento, sin embargo, con la OMS en vías de constitución existía fuerte tendencia a transferir a ésta todas las actividades sanitarias internacionales, propósito que implicaba la absorción o desaparición de la OSP, organismo sustentado en la Organización Panamericana de Salud (OPS), llamada antes de 1958, Organización Sanitaria Panamericana. El Código Sanitario Panamericano (1924) establecía su independencia y su exclusiva respon-

sabilidad ante las Conferencias Sanitarias Panamericanas. Para oponerse a la temida y cercana amenaza, el flamante Director comenzó por consolidar la situación financiera de la Oficina y supo luego con firme convicción y tacto diplomático exponer argumentos y razones que condujeron a un acuerdo (1949) con la OMS, que reconoce su identidad interamericana y su independencia de acción en los asuntos continentales, como Oficina Regional de la OMS en las Américas.

Reelegido por dos nuevos períodos de 4 años, el Dr. Soper dio término a sus funciones directivas en enero de 1959. En sus "Memorias" no se comenta otras actuaciones de su alto mandato, ni tampoco las ulteriores inquietudes sanitarias. Conforme con lo enunciado por uno de sus colaboradores, el Dr. Carlos Luis González [2], llevó a cabo una obra excepcional abarcando programas de erradicación continental del *Aedes aegypti*, del paludismo, de la frambesia (descenso de la prevalencia en Haití estimada en 50 % a 0.8 % en el término de tres años), de la viruela con vacuna liofilizada, etc., a la vez que estimulaba y facilitaba por diversos medios el desarrollo de infraestructuras nacionales de salud.

Después de 40 años (1920-1959) de consagrados y abnegados servicios en la FR y en OSP, este trabajador incansable prosiguió sus tareas de siempre, asesoras y aún directivas en Pakistán Oriental (1960-1962), en EE UU, y en otros países a fin de erradicar el cólera, el paludismo, la viruela, la tuberculosis, el dengue, etc.

El último capítulo del libro titulado "Fracaso de la erradicación de *Aedes aegypti* en Estados Unidos", es una prueba fehaciente del espíritu del autor, libre de ataduras nacionalistas y de intereses ajenos a los de la salud pública mundial. A pesar de haber sido atenuado el texto por correcciones del editor destaca la falta de solidaridad internacional de su país nativo con términos de este tenor: "Estados Unidos fue la última nación americana que emprendió la erradicación... 15 años después de haber contraído la obligación básica y lo hizo como respuesta a las críticas expresadas en repetidas ocasiones por otros países" (p 377).

Y al comentar la "lamentable" decisión unilateral de poner prematuro fin a dicha erradicación advierte: "No le conviene —a EE UU— ignorar las obligaciones mutuas asumidas, ni los solemnes compromisos contraídos por sus delegados, debidamente autorizados ante las conferencias internacionales de salud" (p 379).

Si debemos formular alguna observación al libro analizado anotaremos que diversas anécdotas salpimientan su texto, referidas principalmente a vivencias de sus frecuentes y obligados viajes, no todas acordes con la naturaleza de la obra y de aparente liviandad. Otras, en cambio, son llamativas e inexplicables como la del Director de un Departamento Nacional de Salud que opuso reservas a la concurrencia de Soper a la IX Conferencia Sanitaria por ser un evento inútil, no obstante el interés particular de su asistencia para informar sobre el hallazgo de FA sin *Aedes aegypti* y acerca de la invasión del NE del Brasil por el *Anopheles gambiae*.

Cuantiosa es la producción científica del Dr. Soper, atinente en particular a la aplicación de los nuevos conocimientos a la medicina preventiva y salud pública. Varias decenas de artículos fueron recopilados en el libro "Hacia la conquista de la salud" (1970).

He tenido oportunidad de conocer y tratar personalmente al Dr. Soper durante mi actuación como Secretario General del Departamento Nacional de Higiene (1932-1933), en ocasión de los repetidos viajes que realizó entonces a Bolivia por haberse declarado un foco de FA en Santa Cruz de la Sierra, que impuso la creación del Servicio de FA en el Norte Argentino, puesto bajo la eficaz dirección del Dr. Carlos Alberto Alvarado [3]. Participamos además ambos, en carácter de delegados, en 1934, en la IX Conferencia Sanitaria Panamericana. Pude apreciar sus excepcionales dotes de sanitarista internacional, animado por un objetivo fundamental, la erradicación de las enfermedades transmisibles, con cabal información y rica expe-

2. C. L. González, *Gaceta Médica de Caracas*, 87: 231, 1978.

3. M. Sussini, R. F. Vaccarezza y C. A. Alvarado. *Anales del Dep Nacional de Higiene* 35: 5, 1934.

riencia, con voluntad firme y laboriosidad ejemplar. Era un hombre humanitario, de sentir universal, con un alto ideal, la salud pública, de la que era a la vez eximio administrador y convincente embajador. Es fácil concebir los obstáculos locales o nacionales que se han opuesto a su quehacer, los intereses y ambiciones personales que ha debido apartar y vencer para cumplir su benemérita misión. En uno de los informes anuales de la OSP (1953), al reclamar exigencias que deben satisfacer el personal técnico y administrativo, trasciende cuál era el sentir y el pensar del esclarecido Director: "Hemos de contar con hombres y mujeres de mérito en sus respectivas profesiones que se consagren a la consecución de los objetivos de la Organización, que consideren a las Américas como su campo de acción, a cada Gobierno como el suyo propio, y a cada país como su propio hogar".

Lucen como ejecutorias de la validez de este notable líder de la salud pública las innúmeras distinciones que le fueron conferidas en vida: condecoraciones, premios, medallas, doctorados y títulos honorarios, etc. Entre ellas deseamos reproducir dos menciones por la categoría y significación de las asambleas que las acordaron:

1) La XV Conferencia Sanitaria Panamericana, en 1959, le adjudica el título de "Ciudadano de América" por ser un ejemplo perenne de noble voluntad y de devoción al servicio de la causa de la salud de los pueblos de América". y 2) En 1967, la Asamblea Mundial de la Salud le otorga el Premio León Bernard, como "homenaje por su constante abnegación y su contribución sobresaliente a la causa de la salud pública y la medicina social".

— — — —

Exaggerated claims for the efficacy of a medicament are very seldom the consequence of any intention to deceive; they are usually the outcome of a kindly conspiracy in which everybody has the very best intentions. The patient wants to get well, his physician wants to have made him better, and the pharmaceutical company would like to have made him so. The controlled clinical trial is an attempt to avoid being taken in this conspiracy of good will.

Las pretensiones exageradas respecto a la eficacia de un medicamento muy raramente son la consecuencia de la intención de engañar; habitualmente son el resultado de una gentil conspiración en la cual cada uno tiene las mejores intenciones. El enfermo quiere sentirse mejor, su médico quiere contribuir a que se sienta mejor y la compañía farmacéutica desea haberle dado al médico el poder de hacerlo. El ensayo clínico controlado es una tentativa de evitar que lo atrape a uno esta conspiración de buena voluntad.

PETER B. MEDAWAR

Advice to a young scientist, Harper & Row, 1979

MEDICINA

FUNDADA EN 1939

PUBLICACION BIMESTRAL

(Registro de Propiedad Intelectual Nº 1.051.984)

MEDICINA no tiene propósitos comerciales. El objeto de su creación ha sido propender al adelanto de la medicina argentina. Los beneficios que pudieran obtenerse serán aplicados exclusivamente a este fin

Publicada con el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

EDITORIALES

El reglamento de publicaciones, los autores y las secretarias

Cuando un autor argentino resuelve preparar el manuscrito de su trabajo para enviarlo a publicar en una revista extranjera, con seguridad leerá previamente con mucha atención el reglamento de publicaciones de la revista elegida y luego junto con su secretaria, examinarán detenidamente la diagramación de un trabajo similar al suyo en la revista de marras, e intentarán juntos dar satisfacción plena a las exigencias del editor para facilitar al máximo la aceptación del trabajo. A su vez, el editor extranjero que recibirá el manuscrito, con la ayuda de eficientes secretarias (adecuadamente remuneradas por supuesto) rechazará el trabajo aun antes de enviarlo a los jueces, si el mismo no guarda el estilo y la forma que exigen las normas de su revista; y cuanto mayor sea la oferta de manuscritos, mayores serán las exigencias formales que el editor imponga, y esto no por orgullo o pedantería, sino porque la recepción de material inadecuadamente presentado aumenta y complica las tareas del equipo editor que debe gastar más de su tiempo en observar defectos formales en detrimento del utilizado en el examen científico de todo cuanto recibe.

Cuando un autor argentino envía su manuscrito a una revista argentina puede haber ocurrido una de dos cosas: que originariamente lo escribió para una revista nacional o que lo haya enviado a una extranjera y le haya sido rechazado. En este segundo caso el editor argentino lo descubre de inmediato porque el material le llegará perfectamente tipeado, con muy buenas y breves tablas, pocas y nítidas figuras (que son muy costosas) pero ordenado de modo tal, como si nunca hubiera visto impreso un solo ejemplar de una revista nacional; y ésto ofende. Por ejemplo, los editores de MEDICINA reciben frecuentemente trabajos en inglés con los resúmenes a continuación del título, palabras claves que MEDICINA no publica, bibliografía abreviada según normas que no son las del *Index Medicus*, etc. No hay ofensa en enviar el trabajo rechazado en el exterior sino en no adaptar el trabajo devuelto al reglamento de publicación de MEDICINA. Si el autor escribió su trabajo con la intención inicial de enviarlo a una revista nacional, en general, no extrema su pulcritud, por eso nos permitimos recordarle algunas cosas para que se las transmita a su secretaria:

1. Use una buena máquina de escribir, un buen papel, escriba a doble espacio, deje un buen margen (4 cm a la izquierda) y deje lugar al pie de página, sobre todo de la primera página, donde Ud. verá figurar en la impre-

sión definitiva la fecha de recepción, la dirección postal y, cuando fuera necesario, la aclaración del carácter de becarios o miembros de la carrera del investigador de los autores (pero nunca incluirá allí los agradecimientos, ni la mención de los subsidios recibidos, que conviene que figuren en "agradecimientos" que se imprime a continuación de los resúmenes).

2. Exprese el título en el menor número de palabras (8 aproximadamente). Si es absolutamente necesario que sea más largo es preferible subdividirlo en un título principal y un subtítulo. Utilice las palabras que deban figurar en los índices bibliográficos.

3. Mencione a los autores masculinos con inicial del nombre seguido del apellido y los femeninos con nombre y apellido completos. En el caso del autor femenino conviene que mantenga en uso siempre el mismo apellido, de lo contrario confundirá a los índices internacionales. Por ejemplo: María García debe mencionarse siempre María García y no María G. de González o María González.

4. Mencione con precisión el lugar de trabajo, sin abreviaturas, y siempre igual. Es común que distintos autores de una misma institución la denominen diferentemente. Por ejemplo: Instituto Juan Pérez, Instituto Nacional Juan Pérez, Instituto Nacional de Investigaciones Juan A. Pérez. Es necesario que se entienda claramente que se trabajó en un servicio determinado si se trata de un hospital, pero no interesa el departamento, división o sección.

5. La dirección postal no puede ser la del domicilio particular de uno de los autores, sino la del lugar de trabajo (sin olvidar el nº de Código Postal).

6. No deben mencionarse los cargos de los autores. Sí debe mencionarse el carácter de becario o miembro de la carrera del investigador científico.

7. En revistas politemáticas, como MEDICINA, la introducción tiene que ser escrita con gran claridad para que los lectores no habituados a incursionar en el tema comprendan fácilmente la hipótesis y el interés del o los autores en verificarlas o ampliarlas.

8. En *Material y métodos* deben incluirse todos los datos que necesitaría conocer quien quisiera repetir los experimentos o alguno de los procedimientos. Se describirán con detalles las modificaciones personales introducidas en una técnica, pero no se debe entrar en pormenores cuando se trata de métodos conocidos: es suficiente en ese caso mencionar la referencia bibliográfica original.

No está de más enfatizar aquí, la conveniencia de consultar al estadígrafo cuando se diseña originalmente el trabajo y la inconveniencia de someterle los datos a su consideración cuando ya se han obtenido los resultados. Esta consulta es particularmente importante cuando se trata de extraer conclusiones válidas sobre la base de estudios epidemiológicos efectuados en poblaciones humanas. No es necesario detallar en el manuscrito el desarrollo analítico con todas las fórmulas estadísticas; es suficiente mencionar el test utilizado.

9. Cuando el Comité de redacción examina un trabajo presta particular atención a la coherencia entre sus distintas partes: lo enunciado en *Material y métodos* como objeto de medición, debe aparecer en *Resultados* y esos resultados y no otras cosas deben ser comentados en *Discusión.*

Una "coherencia" formal, no siempre observada, es la gramatical. La introducción, material y métodos y resultados se redactan habitualmente en "impersonal"; la discusión a veces en primera persona del plural. No puede admitirse que se cambie de forma gramatical o de tiempo de verbo dentro de una de las partes del trabajo.

10. Los resultados pueden expresarse en tablas o figuras (no reiterar los mismos resultados en ambas formas). Si se trata de tablas debe obviarse, sin lugar a dudas, la antigua gran tabla apaisada con muchísimos datos y limitarse a la moderna tabla con la información esencial. Tendrán un título y una leyenda, en hoja aparte, donde se aclararán todas las abreviaturas (nunca se referirá al texto para que se comprendan las abreviaturas, ya que las tablas y figuras deben tener autonomía con respecto al texto). Excepcionalmente un autor es tan buen dibujante como para prescindir de un dibujante profesional. Todo número o signo incorporado a una figura debe ser de tamaño suficientemente grande como para ser percibido fácilmente en cualquier reducción y tener un buen contraste sobre su color de fondo (signo negro sobre fondo blanco o signo blanco sobre fondo negro). En materia de fotografías es esencial que las mismas tengan la nitidez adecuada: la impresión no mejora ninguna figura y sí puede acentuar sus defectos. Los costos de las tablas y figuras son muy elevados de modo que deben publicarse las necesarias y no las superfluas. Cuando envíe el manuscrito escriba con lápiz al dorso de cada ilustración, el número correlativo y una inscripción que permita identificarlas y, en hoja aparte, las leyendas explicativas. Todas las tablas y figuras deben ser mencionadas en el texto y el autor puede sugerir su ubicación definitiva mediante una señal; por ejemplo: "aquí Figura 1" El término "figura" se aplica a todos los dibujos y fotografías, y el término "tabla" no debe ser reemplazado por "cuadro".

11. En materia de cantidades, unidades, símbolos, signos, ecuaciones, abreviaturas y siglas, el desorden puede llegar a inquietar al editor argentino menos exigente. Para aconsejar con exactitud habría que recurrir a un folleto explicativo, pero puede intentarse corregir lo más grosero:

– Cada redactor conoce o debiera conocer la nomenclatura y terminología del área científica en la que trabaja, pero por las dudas es recomendable que se "inspire" en trabajos publicados similares al suyo.

– Las siglas son palabras nuevas, luego no deben separarse con puntos las letras que la componen. Por ejemplo: CONICET y no C.O.N.I.C.E.T.

– Para las unidades de base utilice:

TABLA 1

Medida	Unidad de base del Sistema Internacional	
	Nombre	Símbolo
Longitud	metro	m
Masa	kilogramo	kg
Tiempo	segundo	s
Intensidad de corriente eléctrica	amperio	A
Temperatura	"kelvin"	K
Cantidad de substancia	mol	mol
Intensidad luminosa	candela	cd

Son unidades complementarias:

el radián (rd) para el ángulo plano;

el esteradián (sr) para el ángulo sólido.

En la tabla siguiente se indican una serie de unidades derivadas.

TABLA 2

Medida	Unidad derivada		Unidades derivadas explixcadas en otras unidades
	Nombre	Símbolo	
Frecuencia	hertzio	Hz	1 Hz = 1 s^{-1}
Fuerza	newtonio	N	1 N = 1 kg.m.s^{-1}
Presión	pascalio	Pa	1 Pa = 1 N.m^{-2}
Energía	julio	J	1 J = 1 N.m
Potencia eléctrica	vatio	W	1 W = 1 J.s^{-1}
Carga eléctrica	culombio	C	1 C = 1 A.s
Diferencia de potencial eléctrico	voltio	V	1 V = 1 J.C^{-1}
Capacidad eléctrica	faradio	F	1 F = 1 C.V^{-1}
Resistencia eléctrica	ohmio	Ω	1 Ω = 1 V.A^{-1}

Los múltiplos decimales o las fracciones decimales de las unidades se designan por prefijos enumerados en la Tabla 3. Nótese que los prefijos en su denominación completa sólo pueden utilizarse antepuestos al nombre completo de la unidad, en tanto que su símbolo debe ser antepuesto al símbolo de la unidad.

TABLA 3

Coeficiente multiplicador de la unidad	Prefijo	
	Término	Símbolo
10^{18}	exa	E
10^{15}	peta	P
10^{12}	tera	T
10^{9}	giga	G
10^{6}	mega	M
10^{3}	kilo	k
10^{2}	hecto	h
10	deca	da
10^{-1}	deci	d
10^{-2}	centi	c
10^{-3}	mili	m
10^{-6}	micro	μ
10^{-9}	nano	n
10^{-12}	pico	p
10^{-15}	fento	f
10^{-18}	alto	a

De esta manera el tamaño del eritrocito no debe escribirse 8 μ sino 8 μm (10^{-6} metros = micrómetros).

Como se ve, segundo no se representa con dos vírgulas ("), lo que corresponde a una señal de ángulo, sino por la s (o bien seg). Estas representaciones de unidades no deben ser seguidas de un punto, porque el punto representa al producto entre dos unidades. Tampoco debe usarse el punto para separar unidades, excepto la decimal.

Ejemplo: 0.1 ml, bien;
10.000 revoluciones, mal;
10 000 revoluciones, bien (medio espacio reemplaza al clásico punto);

La coma (,) es una señal gramatical: 0.1 ml, bien;
0,1 ml, mal.

Los exponentes figurarán como es clásico arriba a la derecha: 10^6. Pero los isótopos, para evitar confusión deben indicarse arriba a la izquierda: ^{131}I.

Para las fracciones es conveniente utilizar la barra oblicua para que todo el texto quede impreso en una sola línea: $\frac{a,}{b}$ mal; a/b, bien o $a \times b^{-1}$.

12. No comience una frase con un símbolo o una cifra: "3 pacientes fueron sometidos a"..., mal. "Tres pacientes fueron sometidos a"..., bien. "Fueron sometidos 3 pacientes a"..., bien.

No utilice en la frase dos cifras contiguas. Ejemplo: "durante 1979, 70 pacientes fueron estudiados"..., mal. "Durante 1979, fueron estudiados 70 pacientes"..., bien.

13. Al redactar la discusión, el autor puede optar por diferentes estilos, pero lo que no puede obviar es comentar sus resultados y cotejarlos con los de otros autores que han enfocado el tema de modo similar. En cada tema hay un número limitado de trabajos que han contribuido eficientemente al progreso del conocimiento: es importante confrontar las propias ideas con la de los autores de esos trabajos y abandonar las contribuciones menores al tema.

Con referencia a lo puramente formal, nos permitimos aconsejar no abusar del punto aparte y recordar que, el punto seguido, aunque más fatigante para la lectura, da más continuidad a la idea que se quiere expresar.

No es necesario terminar la *Discusión* con un párrafo dedicado a conclusiones; debe tenerse en cuenta que de todos modos estarán expresadas en el resumen.

14. MEDICINA exige al final del trabajo un resumen en castellano y otro en inglés (para el caso de que el manuscrito sea escrito en castellano), con título en inglés. Los resúmenes, en general, pueden ser "indicativos" o "informativos". Los indicativos expresan el contenido del trabajo pero no dan detalles sobre los resultados y conclusiones: se utilizan frecuentemente en artículos de casuística. Los "informativos" deben informar, en una redacción de 200 a 400 palabras, acerca del objeto, la metodología, los resultados y las conclusiones del trabajo. El resumen en idioma inglés debe ser del tipo "informativo" y hacer referencia a tablas y figuras. También aquí debe recordarse un detalle formal: en los resúmenes no se usa el punto aparte, sino el punto seguido.

15. La "Bibliografía" (no "Referencias") debe presentarse en orden alfabético, con el apellido e iniciales del nombre de todos los autores; con el título de los trabajos, el tomo, página inicial y año. Con observar un número cualquiera de MEDICINA de 1980 puede advertirse que se han obviado los puntos en las iniciales de los autores y la "y", "et", "and", que muchos siguen anteponiendo al último autor.

16. Luego de los resúmenes y antes de la bibliografía muchos artículos incluyen "Agradecimientos": es conveniente que quienes quieran dar a conocer los subsidios recibidos para la ejecución del trabajo, los mencionen aquí y no al pie de la primera página. Con respecto al agradecimiento a personas deberá guardarse un estilo sobrio y no ditirámbico.

A muchos lectores los conceptos aquí expresados, les parecerán un conjunto de perogrulladas; sin embargo, su autor, que ocupa muchas de sus horas trabajando honorariamente para que MEDICINA se edite con pulcritud, puede dar fe de lo mucho que hay que pulir un manuscrito antes de enviarlo a la imprenta.

A. P. BAROUSSE

El peligro de la Bilharziosis

Las enfermedades parasitarias causantes de las grandes endemias en zona tropical son frecuentemente olvidadas en el diagnóstico clínico diferencial, e incluso descuidadas en los programas de estudio en la zona templada. De este modo se desconoce su importancia numérica a nivel mundial. En el caso de la Bilharziosis o Schistosomiasis, 200 a 300 millones de personas se encuentran afectadas en Asia, Africa, el Caribe y Sud América. Esta gran endemia, localizada por ejemplo en el valle del Nilo en Africa, se asocia con una infestación del 50% de la población egipcia. Se han encontrado huevos calcificados de *Schistosoma haematobium* en una momia egipcia de la XXª dinastía (más de 1000 años antes de Cristo) y ya en la Edad Media los médicos árabes hablan de la hematuria en los miembros de las caravanas que retornaban de Timboctu. El parásito fue descubierto por Theodor Bilharz en 1851, y las tres principales especies (*Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* y *S. japonicum*) son individualizadas desde 1904. Cobran una importancia fundamental dado su incremento relacionado con el desarrollo de la irrigación artificial en zona tropical y subtropical. La construcción de grandes represas como fuente de energía hidroeléctrica como Aswan en Egipto, Akosombo (Lago Volta) en Ghana y Kainji en Nigeria ha favorecido la multiplicación de los planorbes del género *Biomphalaria* y *Bulinus*. El incremento del molusco, huésped intermediario específico, favorece la difusión de la enfermedad. En nuestro país la construcción de la represa de Yaciretá-Apipé probablemente determinará una difusión del *S. mansoni*, endémico en Brasil, a nuestras provincias del Nordeste. Este fenómeno debe ser destacado con el fin de prevenir el desarrollo de una endemia que malogre los beneficios económicos obtenible con dicha obra.

El *S. mansoni*, trematode bixesual adulto, habita las venas mesentéricas inferiores. La hembra produce 300 a 3000 huevos por día, que por acción combinada de la peristalsis y secreciones enzimáticas atraviesan las paredes vasculares, los tejidos y llegan a la luz intestinal, de donde son eliminados con las heces. En contacto con agua fresca, se liberan los miracidios ciliados que se multiplican en cercarias infectantes en el caracol específico (*Biomphalaria* en Brasil). Las cercarias abandonan el caracol y en contacto con la piel, la atraviesan en 3 a 10 minutos.

El cuadro clínico corresponde al de una bilharziosis intestinal, con el riesgo de un compromiso hepatoesplénico. A las manifestaciones cutáneas iniciales (prurito del nadador) en las 24 h de la penetración de las cercarias, sigue un período de incubación de 4 a 8 semanas. La fase de invasión o toxémica (Fiebre de Katayama) es menos frecuente en las infecciones por *S. mansoni*. Se trata de un cuadro febril agudo con hepatoesplenomegalia, linfadenopatía generalizada y eosinofilia. En el período de estado las manifestaciones clínicas son esencialmente intestinales (cólicos, tenesmos, síndrome pseudodisentérico). La rectosigmoidoscopía revela lesiones inespecíficas como edema o hiperemia de la mucosa, ulceraciones y, finalmente, granulaciones blanquecinas (bilharziomas) y pseudopólipos inflamatorios, más característicos de la enfermedad. La evolución de las lesiones intestinales es generalmente favorable. El mal pronóstico de la enfermedad se relaciona con la retención del 60 % de los huevos del verme en el organismo (Warren y Mahmoud, 1975). Estos migran al sistema porta y quedan atrapados en el hígado. Allí determinan una reacción tisular granulomatosa compuesta por eosinófilos, linfocitos y macrófagos que

corresponde a 100 veces el volumen del huevo (Mahmoud, 1977). Estas lesiones determinan un bloqueo presinusoidal de la circulación porta que es posteriormente definitivo por la fibrosis consecuente. Clínicamente, el compromiso hepático se manifiesta por hepatoesplenomegalia e hipertensión portal. Por el contrario, la función del hepatocito está llamativamente respetada.

El diagnóstico reposa en el examen parasitológico de materia fecal. Dada la eliminación intermitente de los huevos, el mismo deberá ser seriado y al examen directo deberán sumarse las técnicas de concentración (Kato y Miura, 1954; Bailenger, 1973). El examen en fresco de la biopsia de mucosa rectal ofrece una mayor sensibilidad para el diagnóstico y deberá ser practicada en la unión recto-sigmoidea, aún con mucosa normal. La biopsia hepática puede poner de manifiesto los restos calcificados de los huevos en el centro de las lesiones de una hepatitis granulomatosa.

Con respecto al tratamiento, las drogas clásicas no están exentas de riesgo. El Niridazole es frecuentemente utilizado, pero sus manifestaciones de toxicidad neuropsiquiátrica (especialmente luego del desarrollo del shunt portocava) limita su uso (*Liverpool School of Tropical Medicine*, 1979). En estos casos se ha recomendado el uso de Stibocaptato (antimonial trivalente) (Mahmoud, 1977), pero el riesgo de toxicidad persiste. El Hycanthone, droga efectiva y de breve administración, puede determinar lesiones hepáticas. El oxamniquine, una tetrahidroquinoleína, ofrece la ventaja de su baja toxicidad y administración simple. Recientemente el Oltipraz (35 972 RP), derivado del Niridazole, se ha manifestado como una droga con una actividad de 1.5 a 4 veces superior a la droga original sobre el S. *mansoni* (Leroy y col., 1978). Asimismo, es prácticamente atóxico, salvo por la presencia de náuseas y vómitos en los ensayos terapéuticos preliminares a altas dosis (4.5 g/día). La reducción de la dosis a 1.5-2.0 g en una cura única de 24 h ha permitido reducir substancialmente la incidencia de los efectos colaterales sin reducir su efectividad terapéutica.

La evolución de un tratamiento por medio de técnicas de concentración de materia fecal, y especialmente biopsia de la mucosa rectal con determinación de la viabilidad de los huevos hallados, no puede ser realizada antes de los tres meses de administrada una droga, ya que los parásitos pueden recuperarse de una intoxicación subletal hasta 6 semanas posteriores al tratamiento. En este caso la numeración de los huevos determinará la necesidad de una nueva cura. Frente a un recuento mínimo (50 huevos/gramo de heces) se aconseja una abstención terapéutica y control ulterior, ya que la reducción del número implica una reducción de la puesta interna (con atenuación de los síntomas clínicos y mejoría del cuadro anátomo-patológico). Asimismo, se reduce la posibilidad de infección de los moluscos.

El hecho esencial a considerar es la prevención de esta endemia. Para evaluar el programa de lucha es necesario determinar la incidencia y la intensidad de la infección humana. La profilaxis exige medidas de higiene para prevenir el ingreso de los huevos en el ciclo acuático del parásito y el contacto del hombre con las cercarias infectantes. Si bien el aprovisionamiento de agua doméstica potable reduce la exposición, queda sin solucionar el problema del contacto laboral (actividades agrícolas). La quimioprofilaxis masiva ofrece una solución especialmente con los derivados orales de baja toxicidad, pero su efecto puede estar limitado por el reservorio animal del S. *mansoni* americano. El uso de molusquicidas puede presentar inconvenientes dada la toxicidad para los pescados, efecto secundario de niclosamida, derivados del cobre, estaño y plomo. La N-tritylmorpholina es efectiva y no presenta este problema (O.M.S., *Rapp Techn*, 1973). Los métodos biológicos pueden contribuir en el programa de control: secado periódico de canales de irrigación por medio

de sifones automáticos (si la pérdida de agua suplementaria es tolerada por los cultivos); destrucción de vegetales (alimento de los moluscos); uso de predadores naturales (ampularídeos como *Marisa cornuaretis* que demostró su efectividad en Puerto Rico). Este último método exige el estudio de las consecuencias para la salud y la importancia ecológica de la introducción de este molusco que deberá ser prefentemente indígena (O.M.S., *Rapp. Techn.*, 1973). Probablemente lo esencial es el planeamiento adecuado de las obras de irrigación con el fin de prevenir el desarrollo de los moluscos: reducir o eliminar los reservorios de acumulación nocturna, revestir los canales de irrigación con hormigón, reducir la cantidad de agua de drenaje por medio del reglado del agua de irrigación, etc.

En conclusión, solamente un enfoque multidisciplinario prevendrá la importación de esta endemia tropical a nuestro país. Dada la complejidad del problema y el hecho de ser la consecuencia directa de la puesta en marcha de obras de interés energético y agrícola, el costo del plan de lucha no debe estar exclusivamente a cargo del presupuesto de salud pública.

ALFREDO J. RONCORONI

Corea de Hungtington

S. Kinnier Wilson, en su magnífica obra de Neurología publicada en 1941, inicia el capítulo dedicado a la corea de Hungtington expresando que "conspicua entre las enfermedades nerviosas degenerativas, existe una, de la vida adulta, que se distingue por la asociación de movimientos coreicos persistentes y progresivos con deterioro mental y, especialmente, por su incidencia heredofamiliar". Con esto señala los tres elementos fundamentales de esta enfermedad descripta por Hungtington en 1872 que, en los últimos años, ha dado origen a numerosos estudios epidemiológicos, clínicos, patológicos y, más recientemente, a la búsqueda de anomalías bioquímicas y citobiológicas que permitan una mayor comprensión de este cuadro.

La corea de Hungtington ha sido descripta prácticamente en todo el mundo, sin distinción de razas. La enfermedad se transmite en forma mendeliana autosómica dominante con una penetrancia casi completa y con una frecuencia de mutación estimada en 5×10^{-6} por locus, una de las más bajas conocidas en genética humana. Los pacientes coreicos parecen ser más fecundos que sus familiares no afectados y los controles normales de la misma edad. La edad de comienzo, la forma clínica y el tiempo de sobrevida de la enfermedad en un determinado paciente podrían estar influidos por el sexo y la edad del progenitor afectado. Estos datos tienen cierta implicancia para el consejo genético, pero su significado es aún poco claro.

Los movimientos coreiformes son el elemento más llamativo del cuadro clínico y presentan ciertos patrones característicos (flexión y extensión de los dedos con desviación cubital de la mano, anteroflexión de la cabeza sobre la región esternal, movimientos espasmódicos de la lengua y los músculos fauciales, marcha vacilante con sacudidas bruscas, etc.). El desarrollo de métodos objetivos y cuantitativos para el registro y análisis de los movimientos coreicos ha permitido una aproximación más precisa y reproducible a los mismos, de indudable utilidad para la discriminación de variantes clínicas de la enfermedad y la valoración de la terapéutica. (Weitzman y col., *Dis Nerv Syst* 37: 264, 1976).

El deterioro mental progresivo es un elemento característico de la enfermedad, aunque se han descripto familias con corea familiar sin demencia. Son bastante constantes, pero de ningún modo específicos de la enfermedad, los trastornos en la codificación de la información y en la memoria inmediata. Por el contrario, y como diferencia fundamental con la demencia de tipo Alzheimer las afasias, apraxias, alexias y disturbios en la orientación son muy infrecuentes, aun en estadíos muy avanzados de la enfermedad. Son comunes en la corea de Hungtington las manifestaciones alucinatorias y confabulatorias, difíciles de diferenciar de la esquizofrenia paranoide.

En más de un tercio de los pacientes (especialmente en aquellos con formas clínicas rígida y/o juvenil) se han descripto alteraciones en la motilidad ocular extrínseca. Estudios electrooculográficos muestran una afectación predominante de los movimientos sacádicos. Estas manifestaciones óculomotoras (que podrían tener su sustrato anatómico en la afectación del área 8 de Brodmann) son consideradas por algunos autores como manifestaciones precoces de la enfermedad en descendientes de los pacientes coreicos pero no son específicas, ya que pueden hallarse en otras enfermedades neurológicas tales como las degeneraciones espinocerebelosas y la ataxia telangiectasia. Alteraciones de la actividad refleja (reflejo H, reflejo trigémino-facial de parpadeo) son frecuentes en la corea de Hungtington y, para algunos autores, son debidas a una disminución de la actividad de interneuronas del tronco cerebral determinada por una sobreinhibición de receptores dopaminérgicos en el striatum.

Hay evidencias que sugieren el compromiso hipotalámico en la enfermedad. Entre ellas se destacan la bulimia, las alteraciones vasomotoras y las anomalías endocrinas que presentan los pacientes. Las alteraciones en la secreción de la prolactina y de hormona de crecimiento (disminuida y aumentada, respectivamente) y, en especial, el comportamiento anormal frente a la prueba de tolerancia a la glucosa (como se observa también en la distrofia miotónica, la ataxia de Friedreich y otros cuadros neurológicos hereditarios), son elementos llamativos de la corea de Hungtington.

Son frecuentes las anomalías electroencefalográficas en la enfermedad (ondas lentas bilaterales, complejos de muy bajo voltaje, disminución de los husos y complejos K y de los potenciales evocados), pero carecen de utilidad para el diagnóstico precoz.

El marcador morfológico de la corea de Hungtington está dado por la atrofia del cuerpo estriado. Esta estructura formada por el caudado y el putamen define el borde externo del ventrículo lateral en forma de una convexidad interna. La atrofia estriatal a menos de la mitad de su tamaño normal produce un aplanamiento de dicho perfil, como puede ser observado por neumoencefalografía o tomografía computada. Se han descripto ciertos índices morfológicos, como por ejemplo, el cociente entre la distancia que separa ambos cuernos frontales y la que separa las cabezas de ambos núcleos caudados (un cociente menor de 2 orienta hacia una atrofia del estriado). Recientemente se ha demostrado que esos índices no permiten distinguir a la corea de Hungtington de otras entidades que comprometen el sistema extrapiramidal. Desde el punto de vista microscópico se aprecia una marcada pérdida neuronal con intensa proliferación glial. Estudios citométricos Dom y col., *Adv Neurol* 1: 369, 1973) del núcleo caudado muestran que la relación neuronas grandes : neuronas pequeñas es de 1/26, a diferencia de la relación 1/145 observada en los cerebros normales. Esta disminución selectiva de las neuronas pequeñas del striatum podría correlacionarse con la pérdida de interneuronas inhibitorias GABAérgicas a ese nivel. El cuadro demencial de los pacientes puede relacionarse con la profunda atrofia cortical observada *postmortem*, con depleción y distorsión de las células ganglionares de las capas 3ª, 5ª y 6ª de la corteza, en

especial del lóbulo frontal. Los estudios de microscopía electrónica muestran un aumento llamativo del contenido de lipofucsina, incremento de las membranas del aparato de Golgi, estructuras mielinosímiles alrededor del pericarion y alteraciones en las crestas mitocondriales. Estos hallazgos en las neuronas son también observados en las terminales presinápticas, pero hay una llamativa conservación de las estructuras post-sinápticas.

Los linfocitos de los pacientes coreicos producen MIF (factor de inhibición de la migración leucocitaria) frente a extractos de cerebro de pacientes que presentaban la enfermedad, pero no frente a cerebros normales. En casi la mitad de los que padecen corea de Hungtington se detectan anticuerpos IgG fijadores de complemento, específicos para antígenos citoplasmáticos caudado-subtalámicos (a diferencia de los anticuerpos descriptos en la corea de Sydenham, éstos no son adsorbidos por membranas del estreptococo hemolítico del grupo A). La presencia de alto título de estos anticuerpos en pacientes parkinsonianos y en parientes de coreicos puede sugerir que, en realidad, se producen en respuesta al daño del estriado. La participación de un factor ambiental aún no definido podría explicar el alto nivel de estos anticuerpos en los cónyuges de los pacientes afectados. Algunos autores han descripto un comportamiento anormal en cultivo (semejante a un "envejecimiento precoz") de los fibroblastos de los pacientes coreicos. Se ha postulado un desequilibrio entre los oligoelementos (Cu, Zn, Str, etc.) presentes en estructuras de los ganglios basales, pero la falta de efectos terapéuticos de la D-penicilamina tiende a disminuir su importancia como factor patogénico significativo en la corea de Hungtington. Hay sólidas evidencias, en la actualidad, de que los síntomas motores de la enfermedad pueden ser debidos al desequilibrio entre por los menos tres neurotransmisores presentes en el striatum : dopamina, acetilcolina y ácido gama-aminobutírico (GABA).

La corea de Hungtington puede considerarse, en cierta forma, como lo opuesto a la enfermedad de Parkinson. Si bien estudios farmacológicos de estimulación e inhibición del sistema dopaminérgico lo sugerían, no había evidencia concluyente de la preponderancia de este sistema en los pacientes coreicos (salvo en la rara forma rígida de Westphal) hasta que Spokes (*Brain* 103: 179, 1980) demostró un aumento del contenido de dopamina en el estriado, como manifestación de una cierta indemnidad de la vía dopaminérgica nigro-estriada a pesar de la intensa atrofia. Este hallazgo (y el de un aumento de dopamina en la pars compacta de la sustancia nigra) explicaría las anomalías motoras, con la posible excepción de las discinesias oro-facio-mandibulares que se atribuyen a un exceso de dopamina en el núcleo accumbens. No parece tener sentido, por lo tanto, postular una "supersensibilidad de los receptores dopaminérgicos" para explicar el cuadro coreico. A pesar de todo esto, la utilización de drogas que deplecionan los depósitos de catecolaminas (reserpina, tetrabenazina), que inhiben nu síntesis (alfa-metil paratirosina) o que bloquean el receptor dopaminérgico (fenotiazinas, butirofenonas) no han dado los resultados terapéuticos esperados. Con algunos derivados fenotiazínicos (perfenazina, flufenazina) se han conseguido resultados favorables en el tratamiento de la corea de origen vascular. Otras drogas que se hallan en evaluación como inhibidores del mecanismo dopaminérgico son el tiapride y la oxipemorida.

La acetilcolina antagoniza los efectos de la dopamina en el estriado. Los pacientes coreicos tienen niveles de acetilcolina en el líquido cefalorraquídeo similar al de los controles, pero sus cerebros muestran una disminución significativa de la concentración de colina acetil transferasa (CAT) y acetil colinesterasa (ACE) a nivel del estriado, además de una disminución del 50 %

de la población de receptores muscarínicos post-sinápticos. Esto último podría explicar el fracaso de las medidas terapéuticas intentadas con el objeto de incrementar la actividad del sistema colinérgico estriatal por medio de la utilización de colina, dietilaminoetanol (que se transforma en acetilcolina en el cerebro) o anticolinesterásicos centrales como la fisostigmina (que produce una mejoría muy dudosa y a expensas de importantes efectos colaterales).

Recientemente se ha demostrado una alteración de los componentes del sistema GABAérgico en el cerebro de los pacientes portadores de corea de Hungtington. Hay una disminución de los niveles de GABA en el LCR, una caída de la concentración de su metabolito, la homocarnosina, en varias áreas del encéfalo y, fundamentalmente, un llamativo descenso de la actividad de la enzima limitante para la síntesis del GABA (GAD o glutamato decarboxilasa), que alcanza a un 85 % en el striatum y un 60 % en otras estructuras del neuroeje. A diferencia de lo que ocurre con los receptores muscarínicos, la capacidad de fijación de los receptores al GABA permanece intacta. Se ha intentado incrementar la actividad del sistema GABAérgico por medio del aporte de glutamato y de GABA en forma directa, de la inhibición de la enzima metazolizante del GABA (GABA-T o GABA tronsaminasa) con el uso de isoniazida, valproato de sodio y dipropilacetato y, finalmente, con agonistas post-sinápticos del receptor al GABA, tales como el muscimol, el ácido imidazolacético y el baclofen. A pesar de la excelente evidencia bioquímica de una disminución de la actividad GABAérgica en el striatum y de la esperanza de efectos terapéuticos eficaces dado que los receptores al GABA no parecen tener alteraciones, los resultados obtenidos han sido descepcionantes. El único resultado claro fue el obtenido con la utilización de dosis altas de isoniazida (Perry y col., *New Engl J Med* 27: 840, 1977) aunque datos recientes (Neophytides y col., *Neurology* 30: 383, 1980) no parecen confirmarlo.

La manipulación farmacológica del sistema serotoninérgico (cuyo posible papel patogénico estaba sugerido por el hallazgo de una disminución del 50 % de los receptores a la serotonina en el striatum de los pacientes coreicos) no ha dado ningún resultado terapéutico significativo. La utilización del litio (en especial asociado al haloperidol) ha brindado cierta mejoría de los trastornos psíquicos, sin modificar al cuadro discinético, y no parece tener lugar en el tratamiento habitual de los pacientes coreicos.

Algunos neuropéptidos podrían jugar un papel en la corea de Hungtington. Se han encontrado niveles elevados de sustancia P en el striatum y la sustancia nigra de estos pacientes. Los conocidos efectos estimulantes de la sustancia P sobre las neuronas dopaminérgicas nigroestriadas, su papel potenciador de la amnesia retrógrada descripto en la rata (si se tiene en cuenta los trastornos amnésicos que se presentan los pacientes) y la respuesta favorable al baclofen (que antagoniza los efectos de la sustancia P en neuronas de la médula espinal) en las formas rígidas de la enfermedad, son sugestivos de una participación del polipéptido en, por lo menos, algunas de las manifestaciones clínicas. Arreghi y col. (*Ann Neurol* 2: 294, 1977) hallaron una disminución de la enzima de conversión de angiotensina I en angiotensina II de una magnitud comparable a la observada para la glutámico-decarboxilasa (83 a 92 % en el globus pálidus y 62 a 69 % en el estriado). Si bien el significado de estos hallazgos es aún incierto, es interesante el hecho que dos funciones reconocidas de la angiotensina II en el encéfalo, tales como la conducta dipsógena y la regulación de la presión arterial, se hallan alteradas en los pacientes portadores de la enfermedad.

A pesar de los adelantos alcanzados en el conocimiento de la corea de Hungtington no tenemos disponible, hasta el momento, un tratamiento de eficacia comparable al logrado con la incorporación de la L-DOPA para la enfer-

medad de Parkinson. Todavía los pacientes coreicos manifiestan las consecuencias de la progresión ininterrumpida de su incapacidad, derivada de los movimientos coreiformes y del deterioro intelectual y que habitualmente culmina, luego de un lapso de hasta veinte años, con un episodio de bronconeumonía, si es que la tragedia derivada de la mala calidad de su vida no lo lleva, como no infrecuentemente ocurre, al suicidio.

EDUARDO E. BENARROCH

— — — —

How can committees lay out plans for research when the next set of experiments, at every stage, must be governed by events that can only occur in the mind of the individual investigator? It is surprise that must be sought, if the research is to get anywhere. When things that we assumed as axioms suddenly turned out to be wrong, when observations are made which don't seem to fit with anything, when someone in the laboratory says, "but that is absolutely impossible!", then you know that the work is going well. A committee, by its very nature, cannot plan this kind of event; committees are programmed to prevent astonishment...

This kind of science depends on unpredictable observations, accidents, surprises, solitary human imagination. If you want to plan work of this kind, you must plan to have the brightest people with the most agile and open minds doing the work, leading themselves down their own garden paths, running into snags, tripping over things, being amazed. This is, in real life, the way the system works...

¿Cómo pueden los comités diseñar planes de investigación si el próximo experimento, en cada caso, debe depender de iniciativas que sólo pueden surgir de la mente del propio investigador? Se debe buscar la sorpresa, si se quiere que la investigación progrese. Cuando lo que teníamos como axiomático empieza a cambiar de repente, cuando surgen observaciones que no encajan en lo habitual, cuando alguien en el laboratorio dice "esto es absolutamente imposible!", entonces se sabe que el trabajo marcha. Un comité, por su misma naturaleza, no puede planear este tipo de conducta; los comités están programados para impedir sorpresas...

Este género de ciencia depende de observaciones inesperadas, de accidentes, de sorpresas, de la imaginación humana solitaria. Si se quiere planear este tipo de trabajo, se debe buscar la gente más lúcida, con la mente más ágil y más amplia de horizonte, buscando su propio camino, salvando obstáculos, salteando inconvenientes, encontrando sorpresas. Esta es la forma en que el sistema anda en la vida real...

LEWIS THOMAS

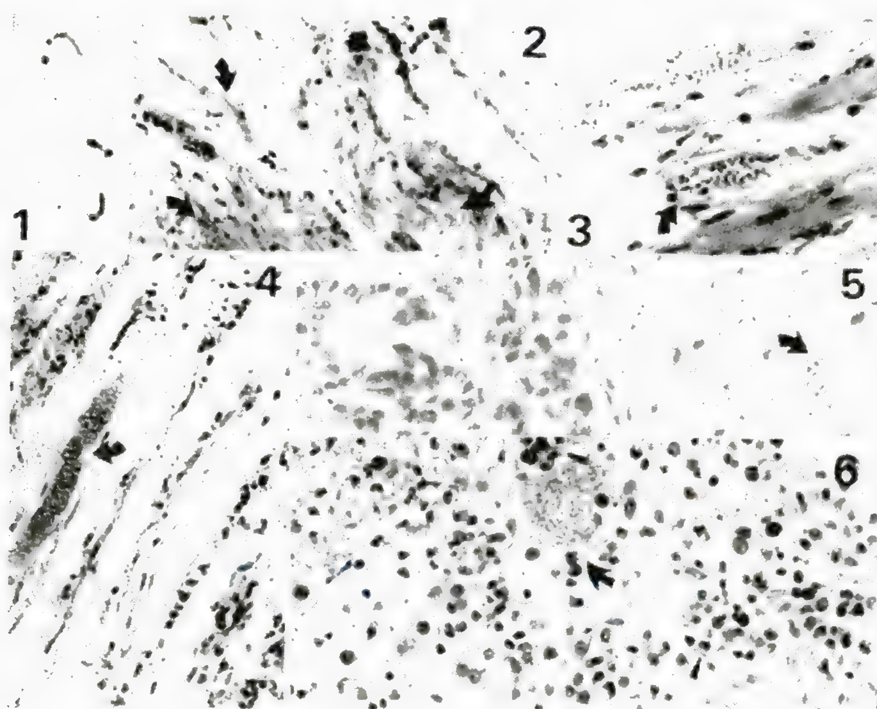
Immunobiology of bone marrow transplantation. Introduction.
Grune & Stratton, 1976

Aislamiento de una cepa de Trypanosoma cruzi **a predominio de formas delgadas en la Argentina**

La existencia de tripomastigotes circulantes de *Trypanosoma cruzi* con morfología diferente fue señaladas por Chagas ya en 1909[5]. En general, al comienzo de una infección aguda experimental predominan las formas delgadas *(slender)* las que paulatinamente son reemplazadas por formas gruesas *(broad)*; esto motivó que se asociara a las primeras con parásitos jóvenes y a las segundas con el estado adulto del mismo[4, 6]. Sin embargo, en 1963 Brener y Chiari llamaron la atención acerca de la existencia de cepas en las que predominan las formas delgadas en la circulación durante todo el curso de la infección y describieron cepas con un tercer tipo de morfología que denominaron *stout* (rechoncha)[3]. Desde entonces son numerosas las características que han sido estudiadas para el estadío tripomastigote de dos cepas, Y y C1, consideradas como prototipo de las formas delgada y rechoncha respectivamente. Las cepas a predominio de formas delgadas son aparentemente escasas en la naturaleza; en nuestro laboratorio sólo hemos aislado una con esta característica (RA) y en la presente comunicación se describe su aislamiento, así como la curva de parasitemia que la misma cumple en el ratón y su histotropismo.

El 27 de febrero de 1978 la paciente RA de 10 años de edad, sexo femenino, proveniente de Gral. Pico, La Pampa, concurrió al Hospital de Niños de Buenos Aires con un cuadro clínico campatible con el período agudo de la Enfermedad de Chagas. Presentaba una blefaritis bipalpebral unilateral acompañada de adenopatías submaxilares e hipertermia; la auscultación cardíaca era normal y el ECG y Rx de tórax estaban dentro de los límites normales. El diagnóstico parasitológico realizado por gota fresca evidenció la presencia de tripomastigotes circulantes confirmándose la etiología de su enfermedad. El estudio serológico demostró anticuerpos específicos contenidos tanto en la fracción IgM como en la IgG, los que fueron detectados por las pruebas de aglutinación directa con caída significativa del título de aglutininas después del tratamiento del suero con 2 mercaptoetanol y por inmunofluorescencia indirecta utilizando los conjugados anti-IgG y anti-IgM humanos marcados con isotiocianato de fluoresceína (Laboratorios Cappel)[7, 8].

Una muestra de sangre entera obtenida por punción venosa con anticoagulante (heparina 10 U/ml) se inoculó en ratones lactantes (10 días) de la cepa Rockland por vía subcutánea (0.05 ml/ratón). Los ratones positivizaron su parasitemia a los 10 días de inoculados y a los 15 se realizó el pasaje de sangre total parasitada a un nuevo lote de ratones lactantes (1 x 10^4 parásito/ratón). A partir del 4º pasaje se utilizaron



Figs. **1-6.** — **1**, Tripomastigotes circulantes de la cepa RA; **2**, Nidos de amastigotes en miocardio (←) con discretos infiltrados leucocitarios focales (64 x); **3**, Nidos de amastigotes en miocardio (96 x); **4**, Corte de músculo esquelético con destrucción tisular e infiltrado leucocitario; la ← señala un nido de amastigotes conservado (69 x); **5**, Nido de amastigotes (←) en capa muscular de intestino grueso (64 x); **6**, Corte de hígado que muestra sinusoides dilatados con evidencias de actividad leucopoyética y un nido de amastigotes (←) (64 x).

ratones Rockland de 25 días que se inocularon por vía intraperitoneal con 2×10^5 parásitos/ratón. Desde el 2º pasaje los ratones inoculados mueren en el 100 % con una sobrevida de 18-20 días, la que se fue acortando hasta reducirse a 12 días a partir del 8º pasaje; esta sobrevida se mantiene en la actualidad (pasaje nº 130). La forma circulante que predomina en esta cepa es delgada, de aspecto semejante al descripto por Brener para la cepa Y [7] (Fig. 1). Las parasitemias inducidas en ratones por la cepa Y presentan un pico a los 7 días de infección con caída posterior [7]. Las inducidas por la cepa RA también presentan un pico entre los 6-9 días post infección dependiendo del inóculo. Este pico no se registra en aquellas cepas en que las formas gruesas o rechonchas son las que predominan en la circulación [7] (y observación personal).

Los estudios histopatológicos de ratones inoculados con 50 000 parásitos y sacrificados a los 12 días de infección mostraron gran invasividad para casi todos los tejidos observados, con una constante y más importante invasión muscular (Fig. 2-6). Así, se encontró en miocardio gran cantidad de nidos de amastigotes (Figs. 2-3); siendo éstos hallados en menor cantidad pero de manera constante en músculo esquelético (Fig. 4), tubo digestivo (exófago, intestino delgado y grueso) (Fig. 5), así como también a nivel de la capa muscular de vejiga y bronquio. En todos ellos se comprobó la existencia de infiltrado leucocitario, predominantemente mononuclear, de distribución focal y fenómenos aislados de necrosis tisular: la intensidad del infiltrado se halló en relación directa con la cantidad de parásitos presentes. En SNC se encontraron escasos nidos de amastigotes en todos los animales estudiados, pero sólo en la mitad de ellos se hallaron pequeños focos de infiltrado mononuclear. El bazo presentó necrosis masiva de la pulpa roja en el 40 % de los animales, mientras el resto mostró necrosis focal concomitante con intensa congestión y pequeñas áreas de hemorragia; en el 60 % se hallaron parásitos sueltos o fagocitados, fundamentalmente en las zonas de necrosis o en su adyacencia. En todos los ganglios linfáticos estudiados se encontraron escasos nidos de amastigotes, coexistentes con una moderada hiperplasia reticuloendotelial. En hígado se observó un llamativo aumento de hemopoyesis a expensas de todas las series, produciendo intensa dilatación sinusoidal que en algunos casos comprimía las trabéculas hepatocitarias; en el 40 % de los casos se observaron nidos de amastigotes y/o parásitos sueltos (Fig. 6). En el resto de los órganos estudiados (riñón, páncreas y parénquima pulmonar) no se pudo demostrar la presencia de parásitos.

Si consideramos la mayor y la constante invasión del tejido muscular por esta cepa, en relación con los otros tejidos estudiados, podemos clasificarla como miotrópica. Este miotropismo es una diferencia importante de destacar con respecto de la cepa Y (ambas delgadas) la cual ha sido descripta como altamente reticulotrópica [2], ya que indica que el histotropismo in vivo no dependería de la morfología del estadío circulante. Como se ha postulado la posibilidad de que las diferencias morfológicas entre las cepas posean un significado biológico, estamos realizando estudios comparativos entre cepas con diferente morfología para el estadío circulante, con el objeto de establecer si alguna característica inmunobiológica es propia de las cepas a predominio de una u otra forma.

1. Brener Z: Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 59: 19, 1965.
2. Brener Z: Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi:* two types of parasites population distinct characteristics. *PAHO Scientific Publication* 347: 11, 1977.
3. Brener Z, Chiari E: Variações morfológicas observadas em diferentes mostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 5: 220, 1963.
4. Brumpt R: *Schizotrypanum cruzi:* différentes phases de son cycle évolutif. *Bull Soc Pathol Exot* 5: 261, 1912.
5. Chagas C: Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n gen n sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159, 1909.
6. Pizzi T: Inmunología de la Enfermedad de Chagas. *Monografía Universidad de Chile (ed)* 7: 183, 1956.
7. Schmuñis G et al: Anti-*Trypanosoma cruzi* agglutinins in acute human Chagas' disease. *Ann J Trop Med Hyg* 29 (2): 170, 1980.
8. Vattuone N et al: Antibody response and immunoglobulins levels in human with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas' disease). *J Trop Med Hyg* 76: 45, 1973.

Stella M. González Cappa, A. Tania Bijovsky, H. Freilij, Leticia Muller, Alejandro M. Katzin

Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Universidad de Buenos Aires y Hospital de Niños, Buenos Aires

Patología del infarto agudo de miocardio

Nuestro artículo "Patología del infarto agudo del miocardio (IAM)" [*Medicina (Bs Aires)* 40: 302, 1980] ha sido comentado en una carta al comité de Redacción [*Medicina (Bs Aires)* 40: 620, 1980]. El Dr. Sundblad dice que el trabajo se basa en material estudiado con la "habitual metodología". Esto nos pone muy contentos, pues significa que nuestras sugerencias [6] han sido aceptadas y que se efectúan rutinariamente planimetría de las áreas necróticas, tinción macroscópica con nitro-blue de tetrazolium, macrosecciones y planimetrías histológicas y estudio seriado del árbol coronario mediante secciones transversales cada 2 mm. De manera que en un futuro inmediato estaremos en condiciones de sacar conclusiones de grandes casuísticas de IAM estudiados en nuestro país, con la "habitual metodología". Se considera que el trabajo de Erhardt [3] no es

suficiente para sostener que la trombosis coronaria (TC) es un hecho secundario en el IAM y que ha sido "rebatido" por Kravis [5]. Erhardt estudió siete pacientes en los que se inyectó fibrinógeno marcado después de la admisión a la unidad coronaria por un IAM en curso y en 6 de los cuales se halló en la autopsia que toda la TC contenía radioactividad, demostrando que la TC es un hecho secundario en el IAM. En cambio, Kravis estudió la incorporación de fibrinógeno marcado en trombos provocados en venas de miembros inferiores en perros, que obviamente no tiene nada que ver con las TC que acompañan a los IAM en curso. En realidad, lo que dice Kravis es que el estudio de la incorporación de fibrinógeno marcado en trombosis venosas en el perro tiene algunas limitaciones [5] pero con eso no se rebate a Erhardt.

Seguiremos rechazando los trabajos de Chapman ya que no acepta a los IAM subendocárdicos como infartos verdaderos, pues la definición de IAM es: "necrosis visible a simple vista relacionada a una oclusión de una arteria o a la reducción del flujo sanguíneo" [2]. Es erróneo que "...hay consenso general en que estos IAM (subendocárdicos) deben excluirse de la discusión ya que el mecanismo fisiopatogénico sería diferente". En el trabajo citado por Sundblad [4] se explica la fisiopatología de la isquemia subendocárdica (no del IAM subendocárdico) como debida a una caída en la relación entre el índice de presión diastólica (oferta) (DPTI) y el índice de presión sistólica (demanda) (SPTI), tal como ocurre en la anemia, estenosis y/o insuficiencia aórtica, estenosis supraventricular aórtica, infusión con isoproterenol, ejercicio brusco en pacientes con aterosclerosis coronaria y en pacientes sometidos a cirugía cardiovascular. Pero en el IAM lo que ocurre es diferente: ..."*in this condition aortic blood pressure may fall and left ventricular diastolic pressure may rise while there is often tachycardia. These changes may lower DPTI : SPTI so much that generalized subendocardial ischemia is added to the focal ischemia of the infarct. Left ventricular function is depressed more than expected for the size of the infarct and, in addition, the reduced subendocardial blood flow might jeopardise the viability of the periinfarct region and cause the infarct to extend*" [4]. Como vemos, no se dice en ningún momento cuál es el mecanismo de producción del IAM subendocárdico, ni que éste sea diferente de los transmurales. Luego de revisar la bibliografía a nuestra disposición debemos concluir que "el consenso general" al que se refiere el Dr. Sundblad se reduce sólo a Chapman [2] y a él mismo. Recordemos que, al menos experimentalmente, todos los infartos comienzan por el subendocardio. Sundblad confunde IAM subendocárdico con isquemia o necrosis subendocárdica difusa o circunferencial (cuadro clínico con/sin angor, asociado a situaciones médicas o quirúrgicas ya citadas).

Otro de los comentarios dice que las técnicas utilizadas "han sido abandonadas luego de varios años de utilización debido al casi nulo aporte que representan en cuanto a la sensibilidad para la detección temprana de la isquemia". La técnica de Barbeito-López fue utilizada en IAM por primera vez por nosotros en 1976 [7] y sus bondades para señalar necrosis recientes han sido largamente aceptadas en numerosas publicaciones internacionales (ver bibliografía de nuestros trabajos MEDICINA *(Bs Aires)* 40: 302, 1980 y 38: 271, 1978) y conocida su utilidad para necrosis tempranas por especializados en cardiopatología (Dres. Salinas Madrigal, L, México; Baroldi G, Italia; Becú LM, Alonso D y Ferrans V, USA). En cuanto al nitro-blue de Tetrazolium es una de las técnicas que más se usan en todo el mundo [1, 8] y "no ha sido abandonada", según la revisión [9] erróneamente citada.

Se afirma también que "se presentan conclusiones diferentes a la mayoría de los autores, basándose no sólo en resultados similares sino en referencias a trabajos previos que otros utilizaron para arribar a conclusiones opuestas". Evidentemente, las citas 8, 70, 71, 74, 39, 2, 10, 20 y 65 no fueron leídas por el autor de la carta, ni la Discussion del *Florence International Meeting on Myocardial Infarction* [2], donde nuestro trabajo fue presentado y discutido. Más adelante, el Dr. Sundblad ocupa el 30 % de su carta para discutir el tema de "Muerte súbita" (?) (no tratado en nuestro trabajo), para terminar diciendo que por la brevedad de su explicación quedan varios puntos sin fundamentar (!!). Entre las revisiones que recomienda para suplir dicha falencia, señala a la de Bastaroli y Vázquez [*Medicina (Bs Aires)* 34: 64, 1973]. En dicho trabajo, los autores concluyeron que "...el trombo aparece primero y el infarto después". Luego de siete años, el Dr. A. Vázquez señala como co-autor de nuestro trabajo el carácter secundario de la TC. Esperamos que en mucho menos tiempo el Dr. Sundblad comparta nuestras conclusiones, aunque como dice W. C. Roberts [4]: *"The question of thrombi in coronary arteries is obviously an emotional issue"*.

1. Alonso D, Jacobstein JG, Cipriano P, Roberts A, Alonso M, Kline S: Early quantification of experimental myocardial infarction with Tecnetium —99 m Glucoheptonate: Scintigraphic and anatomic studies. *Am J Pathol* 42: 251, 1978.
2. Discussion. Proceedings of the Florence International Meeting on Myocardial Infarction Volume 1, *Excerpta Medica*, p 86, 1979.
3. Erhardt LR, Lindman T, Mellsted H: Incorporation of ^{125}I labelled fibrinogen into arterial thrombi in acute myocardial infarction in man. *Lancet* 1: 387, 1973.
4. Hoffman JUE, Buckberg GD: Pathophysiology of subendocardial ischemia. *Brit Med J* 1: 76, 1975.
5. Kravis IC, Shibel EM, Brooks BS, Moset KM: Incorporation of radiolabelled fibrinogen into venous thrombi induced in dogs. *Circulation* 49: 158, 1974.
6. Milei J, Núñez R: Oclusión coronaria reciente. Infarto agudo de miocardio. *Rev Arg Cardiol* 44: 19, 1976.

7. Milei J. Núñez R, Rapaport M: The early pathological diagnosis of ischemia and acute myocardial infarction. XI Congress of the International Academy of Pathology, Washington DC, October 1976.
8. Noakes TD, Opie LH, Rose AG, Kleynhans PH: Autopsy-proved coronary atherosclerosis in marathon runners. *New Engl J Med* 301: 86, 1979.
9. Robbins SL: Cardiac pathology. A look at the last five years. *Hum Pathol* 5: 9, 1974.

J. Milei, N. J. Bolomo, A. Vázquez

Hospital Instituto de Cardiología,
Academia Nacional de Medicina,
Buenos Aires

* * *

La carta de los Drs. Milei y col. en relación a mi comentario sobre el trabajo "Patología del infarto agudo de miocardio (IAM)", me lleva a replantear la crítica con mayor claridad. Para ello utilizaré como guía los reparos que los autores hacen en la mencionada carta.

1) La metodología del estudio es, según creo, la "habitual metodología", ya que la evaluación cuanti y cualitativa de áreas isquémicas y/o necróticas con diferentes métodos así como el estudio seriado del árbol coronario aparece en la mayoría de las publicaciones que sobre el tema han aparecido desde hace algunos años. Pueden verificarse los artículos correspondientes a series anatomopatológicas citados en estas cartas y algunos de nuestros trabajos (*Medicina (Bs Aires)* 37, 521, 1977; *Medicina (Bs Aires)* 38: 616, 1978 y comunicación al XVII Congreso Argentino de Patología en Buenos Aires, Noviembre de 1980: "El diagnóstico precoz de infarto agudo de miocardio").

2) Respecto del trabajo de Erhardt y col. en mi carta anterior cité sólo dos artículos uno de los cuales está, tal como dicen Milei y col., realizado en venas de perros. Ambos demuestran la aposición de fibrina en trombos formados. Por considerarlas suficientes y por razones de espacio obvié otras referencias que ahora mencionaré: W Fulton y col., *Am J Cardiol* 39: 322, 1977 (Abstract); C Moschos y col., *Circulation* 54: 653, 1976; y A Salimi y col., *Circulation* 56: 213, 1977; el primero de ellos en coronarias de hombres con IAM y los últimos en coronarias de perros muestran que la incorporación de fibrinógeno marcado es el resultado de la progresión del trombo coronario, hecho que se produce hasta 72 horas después de iniciada la oclusión. No es mi intención desacreditar a Erhardt ni a su tan citado artículo, sino puntualizar que nuevas observaciones permiten una diferente y más exacta interpretación de su experiencia.

3) En relación al infarto subendocárdico y su (mi) confusión con la necrosis subendocárdica difusa creo que vale la pena aclarar que el infarto subendocárdico, pequeño o grande, y la necrosis subendocárdica difusa si bien en ocasiones responden a condiciones clínicas y fisiopatológicas diferentes, ambas son necrosis del miocardio no relacionadas, por lo menos frecuentemente, a trombosis coronaria y sí a circunstancias hemodinámicas desfavorables al subendocardio. De ahí que creo que el trombo coronario no está en discusión cuando se trata de esta lesión. Si aceptamos, además, que hay dos tipos de infarto, el transmural y el subendocárdico, que a los fines de esta discusión puede incluir la necrosis subendocárdica difusa, y que el subendocárdico es generalmente independiente de la trombosis coronaria, queda claro entonces que el punto a discutir es el infarto transmural y su relación con la trombosis coronaria. Los principales trabajos que tratan el tema incluyen para la discusión sólo aquellos infartos que comprometen más del 50 % del espesor de la pared ventricular, es decir los infartos transmurales (W Roberts y col., *Am J Med* 52: 425, 1972; Chapman J, *Mount Sinai Hosp* 35: 149, 1968; Davies y col., *Brit Heart J* 38: 658, 1976; Chandler y col., *Am J Cardiol* 34: 823, 1974; Davies y col., *J Path* 127: 99, 1979). Esta es la razón por la que sigo pensando que "hay consenso general en que estos infartos (subendocárdicos) deben excluirse de la discusión, ya que el mecanismo fisiopatogénico sería diferente".

4) Con referencia a que las técnicas empleadas "han sido abandonadas" en cuanto a su utilización para la detección temprana del IAM, debe tenerse presente que la frase sigue a otra que reza: " Milei y col. dicen que incluyeron casos de IAM muy reciente, de aproximadamente 48 horas de evolución, y que esto fue posible ahora merced a la aplicación de técnicas especiales". El trabajo también menciona que en otras publicaciones casos de esta índole pasaron por muertes súbitas. Todo esto induce al lector a creer que el artículo contiene un hecho original como sería la inclusión de infartos muy recientes, más recientes que los incluidos en otras series, y que esto fue posible merced a técnicas nuevas. Pero en el estudio que comentamos los casos más, el diagnóstico de IAM antes de las 48 horas de evolución, momento en el cual el IAM se hace visible a simple vista y hace innecesaria cualquier técnica auxiliar para certificarlo. Además, el diagnóstico de IAM antes de las 48 horas y después de 6 horas puede comprobarse por cambios microscópicos inflamatorios descriptos por Mallory y col. hace más de 40 años (*Am Heart J* 18: 647, 1939). Con relación a las técnicas abandonadas, a la de nitro-blue de tetrazolio fue descripta hace 17 años (Nachlas y col., *Am J Path* 42: 379, 1963) y pareció al principio que podía superar la barrera de las 6 horas, posibilidad que luego de varias experiencias quedó descartada (*J Path* 127: 93, 1979). De manera que si bien el nitro-blue sigue siendo usado en todo el mundo, su utilidad radica en la buena delineación macroscópica que brinda a las lesiones de más de 6 horas de evolución. Con respecto a la fucsina básica, también utilizada en el estudio, no creo sea empleada en la actualidad en muchos laboratorios, pues sus resultados son reconocidamente aleatorios (*Arch Path* 100: 516, 1976). También se menciona la búsqueda de

fibras onduladas que Bouchardy y Majno describieron como indicador sensible de isquemia (*Am J Path* 74: 301, 1974), observación refutada por trabajos posteriores, entre ellos uno nuestro [*Medicina (Bs Aires)* 36: 431, 1976] que mostraron el escaso valor de este signo.

Quiero terminar este punto con una pequeña consideración final. Las primeras 4 a 6 horas del IAM son, desde el punto de vista anatomopatológico, la "zona ciega" en su historia natural. La detección e inclusión de estos casos será un valioso y original aporte que muy probablemente arroje luz sobre los mecanismos patogénicos. Y en este sentido el trabajo de Milei y col. no aporta datos nuevos.

5) La afirmación "se presentan conclusiones diferentes a la mayoría de los autores..., etc." debe leerse en el contexto total de la idea expresada en esos párrafos y no en forma aislada. Esta frase se refiere a que el trabajo no aporta elementos nuevos en relación a lo ya conocido, y que las conclusiones no surgen claramente de los resultados. Me permito reiterar el párrafo final que completaba este punto: "Uno esperaría que una investigación cuya conclusión más importante es novedosa (sobre todo por el carácter definitivo de sus afirmaciones) se base en resultados nuevos o en referencias a experiencias recientes que den por tierra con los conocimientos previos".

6) No dejará de sorprender a quien haya leído mi carta la afirmación que el 30 % de la misma trata sobre muerte súbita y que el espacio utilizado en este tema aparentemente no relacionado pudo destinarse a fundamentar mi posición. Me tomé el ingrato trabajo de contar los renglones relacionados con muerte súbita y el número total de renglones de la carta. El resultado es 10/136, es decir aproximadamente 7 %, cifra que está lejos del 30 % que me fue cargado. Si rocé la muerte súbita, y 10/136 renglones es rozar, es porque creo que hace al tema en cuanto a que es un cuadro generalmente isquémico y muchos de ellos han sido confundidos con IAM. También hice la salvedad que el artículo de Milei y col. no había mezclado este cuadro con los IAM. Con respecto a fundamentar mi posición recomendé y sigo recomendando las referencias citadas porque creo que exponen el problema con una claridad y documentación que no justifica su transcripción ni otros agregados. El cambio de opinión del Dr. Vázquez no invalida las conclusiones de las otras revisiones, una contemporánea con su artículo (*Am J Cardiol* 34: 823, 1974) y dos muy posteriores (*Brit Heart J* 38: 658, 1976 y *J Path* 127: 99, 1979) y probablemente tampoco las del artículo del cual es coautor.

Alberto S. Sundblad

Hospital Privado de Comunidad
Mar del Plata

El estilo de las cartas

Soy suscriptor y lector de MEDICINA desde su primer número. El prestigio adquirido por la Revista tiene relevancia por sí mismo. Es demostración de inteligente y tesonera capacidad para vencer las dificultades que se oponen para la prosecución de una obra que se inició, y sigue fiel a los ideales que la inspiraron. No necesita MEDICINA de mi propio reconocimiento aunque así lo sienta.

Sí, me interesa hacer notar que en la interesante sección *Cartas al Comité de Redacción*, algunas de las que se envían, tienen connotaciones particulares; se hacen referencias de persona a persona; se usa una ironía con cierto matiz literario que no está dentro del estilo que debe guiar opiniones distintas sobre un mismo tema.

El reconocimiento científico ofrece permanentes cambios, por eso la modestia es condición inherente a quienes trabajan con seriedad y rigorismo en el amplio campo de la Medicina.

Adalberto R. Goñi

FE DE ERRATA

En el Artículo Especial, *Conferencia Oscar C. Croxatto*, Palabras de Introducción del Dr. R. A. Paz (*Medicina (Bs Aires)* 40: 870, 1980), donde dice: "Todo lo que tenía podía ser utilizado en cualquier momento para ridiculizar algún intento de pensamiento teológico", debe leerse: "Todo lo que tenía podía ser utilizado en cualquier momento para ridiculizar algún intento de pensamiento teleológico".

COMENTARIOS BIBLIOGRAFICOS

Breast disease. D. J. Marchant, I. Nyirjesy (eds). Grune & Stratton, New York, 1979. 322 pp.

Este volumen reúne los trabajos presentados al Simposio Sobre Enfermedades de la Mama, patrocinado por la *Gynecological Society for the Study of Breast Disease*, que se llevó a cabo en New Orleans en mayo de 1978, con la participación de 24 especialistas norteamericanos, 8 franceses y un alemán. La intención fue modesta y dentro de la disparidad de los temas son interesantes las comunicaciones sobre termografía mamaria en mastopatías benignas y malignas, el examen por ultrasonografía y la citología mamaria por punción aspirativa, que ilustran adecuadamente sobre lo que se puede esperar de ellas, especialmente de la primera. Incluye un buen resumen de Joseph Meites sobre regulación neuroendócrina de la lactación y los resultados preliminares de un estudio de Herberman y colaboradores sobre algunas reacciones de inmunidad celular con resultados similares en mastopatías benignas y en cáncer mamario. Otra exposición resume los conocimientos sobre receptores esteroideos en el carcinoma mamario a la fecha del simposio. Entre los más recomendables del libro deben mencionarse los trabajos de Spitalier y Amalric sobre la aplicación de la termografía en la detección del cáncer de mama y en el seguimiento consecutivo a la irradiación, y principalmente la exposición sobre la cirugía con conservación de la masa, tal como se realiza en el Instituto de Cáncer de Marseilles. Cierra el volumen una interesante exposición sobre reconstrucción mamaria después de la mastectomía por los doctores T. D. y E. D. Cronin. Quizá el apremio para lograr la pronta aparición del volumen po rel sistema offset, impidió evitar algunos errores como el deslizado en la página 23, "... in particular pituitary gonadotrophic hormone cortisol...".

Advances in inflammation research. Volumen 1. G. Weissmann, B. Samuelsson, R. Paoletti (Eds). Raven Press, New York, 1979, 640 pp.

Este volumen reune los trabajos presentados al Primer Congreso Internacional de Inflamación, en Bologna, Italia, en 1978. Los 63 trabajos están agrupados en 7 grandes capítulos: membranas y vasos sanguíneos, células inflamatorias, mediadores locales y a distancia, mecanismos inmunológicos de la inflamación, biosíntesis de las prostaglandinas, drogas antiinflamatorias y estudios clínicos. Llama la atención la gama interdisciplinaria de estos estudios; abarcan desde el bioquímico y biólogo celular hasta el farmacólogo, patólogo y clínico. Se describe la estructura básica de las membranas y su respuesta a señales de daño celular. Se insiste en la respuesta inmunológica que acompaña a la inflamación y a la afluencia de mediadores de linfocitos y macrófagos. Se describe la participación de las prostaglandinas y el efecto de drogas antiinflamatorias incluyendo los corticoides. Del punto de vista clínico se describen los procesos de inflamación que acompañan las artropatías y la artritis reumatoidea, la esclerosis sistémica y el lupus eritematoso. Finalmente, se evalúan los tratamientos de estas enfermedades con ciclofosfamida, levamisol, "sulindac" y griseofulvina. Se puede concluir que se trata de un libro repleto de información para inmunólogos, microbiólogos, reumatólogos y patólogos que tratan de entender los complejos mecanismos involucrados en los procesos de inflamación. Hay diferencia de extensión y de detalle en los distintos trabajos presentados. Algunos resumen la investigación presentada en 2 o 3 páginas. Otros, por el contrario, hacen un resumen de los conocimientos pertinentes y luego el artículo original. Creemos que en un tema tan amplio como la inflamación, la presentación puede ser corta, pero si se publica en forma de libro debe ponerse al día el conjunto de trabajos para que pueda comprenderlo el lector que no es especialista en ese determinado y minúsculo punto de la investigación.

En *Orientación Médica* (27: 490, 1978) se publicó un comentario de este Congreso y un editorial, que resumen los artículos de más interés clínico y que fueron presentados por destacados investigadores como S. Samuelsson, G. R. Vane, Guido Majno y Russell Ross. Los varios trabajos que atañen a la ateroesclerosis se resumieron en forma clara y didáctica. Para quien no está trabajando personalmente en el tema, le será más útil el resumen de *Orientación Médica* que el libro de Raven Press, como siempre magníficamente editado.

MEDICINA (BUENOS AIRES)
FUNDADA EN 1939

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

REVISTA BIMESTRAL
(Registro de la Propiedad Intelectual Nº 87.075)

Publicada con el apoyo del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

MEDICINA no tiene propósitos comerciales. El objeto de su creación ha sido propender al adelanto de la medicina argentina. Los beneficios que pudieran obtenerse serán aplicados exclusivamente a este fin

Aparece en Current Contents, Biological Abstracts, Index Medicus y Excerpta Médica

REGLAMENTO DE PUBLICACIONES

MEDICINA *publica trabajos de medicina clínica o experimental, entendiéndose este término en el más amplio sentido de la palabra. Los artículos a publicarse deberán ser originales e inéditos aunque serán también aceptados aquellos que hubieran sido comunicados en sociedades científicas o publicados en forma de «resúmenes». En caso de haber sido presentado a la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, corresponderá mencionarlo citando la fecha de la reunión.*

La redacción se reserva, además, el derecho de introducir —con el conocimiento de los autores— todos los cambios editoriales exigidos por las necesidades tipográficas, la compaginación, el reglamento de publicaciones o por razones económicas.

Casuísticas, Adelantos en Medicina, Artículos Especiales y *Cartas al Comité de Redacción* serán publicados en castellano. Los *Artículos Originales* podrán redactarse en castellano o en inglés indistintamente. Los manuscritos deberán ser escritos a máquina, a doble espacio, y enviados por duplicado.

Las *historias clínicas* serán expuestas sintéticamente. Protocolos, registros, etc., sólo se reproducirán si ilustran significativamente el texto.

Las *tablas*, presentadas en hojas individuales, deberán estar numeradas, ser indispensables y comprensibles por sí mismas, y poseer un título claramente explicativo de su contenido. Sólo se permitirá una superficie total de tablas equivalente a una página de la Revista: todo excedente estará a cargo del autor.

Las *figuras* comprendiendo ilustraciones de cualquier naturaleza (radiografías, fotografías, registros, etc.), se presentarán numeradas correlativamente. En su parte posterior llevarán una inscripción a lápiz que permita identificarlas. Cada figura tendrá una leyenda explicativa. Debe evitarse la superposición de tablas y figuras.

La *bibliografía*, presentada en hoja aparte, deberá limitarse a aquellos artículos directamente relacionados con el trabajo mismo, evitándose las revisiones bibliográficas extensas que sólo serán aceptables en la sección *Adelantos en Medicina*. Las referencias se presentarán numeradas, en orden alfabético de autores *con los títulos de las publicaciones*. Los nombres de la revista figurarán en forma abreviada según el Index Medicus (ej.: J. Clin. Pathol. 19: 391, 1960). Los libros deberán figurar con su título, editor, ciudad y año de aparición.

Resumen: El trabajo deberá presentar un resumen de unas 200 palabras. *Además, contendrá un resumen más explicativo (de hasta 700 palabras) en inglés, con su título completo y con referencias a las figuras y tablas.*

Con motivo del constante aumento de los costos de edición, la Revista se hará cargo solamente de la impresión de 4 páginas (incluyendo tablas y figuras) para cada artículo original. Los autores deberán abonar los gastos que demande la mayor extensión de sus trabajos. El Comité de Redacción se reserva el derecho de solventar totalmente aquellos artículos de investigación clínica que considere de especial interés.

Se ruega enviar dirección postal y número de teléfono particular para facilitar el envío de pruebas de galera.

Secretaría y Redacción. (de 8.30 a 12.30 hs. y de 14 a 18 hs.): Ana G. de Delisio, Instituto de Investigaciones Médicas, Donato Alvarez 3150, 1427 Buenos Aires. T. E. 52-0061/64.

Suscripción	Argentina	$	100.000
	Con cobrador a domicilio	$	110.000
	Números sueltos	$	20.000
	Extranjero	u$s	35

Correo Argentino	Central "B"	Franqueo pagado Concesión Nº 856
		Tarifa reducida Concesión Nº 666

Publicidad: Dr. Horacio J. Delisio, T. E. 52-0061/64
Sra. Nélida B. de Pecoraro

Las suscripciones corresponden de enero a diciembre de cada año. Los pagos se podrán hacer personalmente o por correo con cheques o giros a la orden de **Medicina**.

Impreso en ZLOTOPIORO S.A.C.I.F. · Sarmiento 3149 · Buenos Aires · Argentina

TRIFACLOX

Ampicilina+dicloxacilina

Bagó
Investigación y Tecnología Argentina

naprux

analgésico
antiinflamatorio
no esteroide

Como antiinflamatorio, en pruebas experimentales, 55 veces más potente que el Acido Acetil Salicílico y 12 veces superior a la Fenilbutazona.

Como analgésico: 7 veces más activo que el Acido acetil Salicílico.

Mayor tolerancia gastrointestinal: Resultados similares al placebo en la comparación.

No se le conocen manifestaciones nocivas a nivel renal, hepático, SNC, etc.

más efectividad con menos dosis

MAYOR POTENCIA MENOR TOXICIDAD

Fórmula: Cada comprimido contiene: Naproxeno ácido d-2-(6'-metoxi-2'-naftil) propiónico 250 mg; Excipiente, c.s.p. 1 comprimido.

Presentación: El envase original contiene 20 comprimidos.

Posología y forma de administración: La dosis aconsejada es de 1 comprimido por la mañana y 1 por la noche. En algunos casos, a criterio médico, la dosis puede ser aumentada a 1 comprimido por la mañana y 2 comprimidos por la noche o reducida a 1/2 comprimido por la mañana y 1 por la noche

Precauciones: Debido a su gran afinidad por las proteínas plasmáticas, Naprux puede desplazar a otros fármacos. En consecuencia, debe vigilarse su administración en pacientes bajo tratamiento simultáneo con anticoagulantes orales, hidantoínas, sulfonamidas y sulfas de acción prolongada, considerando el riesgo de sobredosificación relativa con estos productos. Como efectos colaterales pueden presentarse excepcionalmente cefalea, somnolencia, náuseas, anorexia, ardor epigástrico y otras alteraciones digestivas.

Andrómaco

ISSN 0025-7680

MEDICINA

BUENOS AIRES

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

★ en inglés

VOL. 41, Nº 2 1981

Los efectos secundarios de la mayoría de los agentes antihipertensivos, modifican los hábitos de vida de los hipertensos especialmente cuando se trata de pacientes jóvenes.

Minipres* 1 mg / 2 mg

Prazosin ClH

Una vida mejor para su paciente hipertenso...

- Reduce la resistencia periférica elevada a través de una vasodilatación arteriolar.
- Este mecanismo de acción permite un eficaz control de la hipertensión arterial con mínima incidencia de efectos colaterales.
- Su acción vasodilatadora arteriolar permite la combinación con betabloqueantes y/o tiazidas mejorando la respuesta anterior, permitiendo la administración de dosis menores y una más baja incidencia de efectos secundarios.

* Marca de PFIZER INC.

DOSIFICACION: Inicial: 0,5 mg 2 ó 3 veces por día durante la primera semana. Luego aumentar progresivamente la dosis diaria en base a la respuesta de la presión arterial del enfermo. **Habitual:** 3 a 6 mg diarios. Puede suministrarse en dos o tres tomas diarias. **Máxima:** 20 mg diarios. **PRESENTACIONES:** MINIPRES* de 1 y 2 mg en envases con 30 y 100 comprimidos ranurados.

CONTRAINDICACIONES: MINIPRES* está contraindicado en pacientes con sensibilidad conocida hacia esta droga. **ADVERTENCIAS:** Aunque no se han observado efectos teratogénicos en estudios realizados en animales la inocuidad de prazosin durante el embarazo no ha sido establecida. Por lo tanto, sólo debe usarse durante el embarazo cuando a criterio del médico el beneficio potencial supere los riesgos posibles. **PRECAUCIONES:** Un reducido porcentaje de pacientes puede responder más rápidamente y en forma más importante que la mayoría. En algunos casos esto ha producido pérdidas repentinas del conocimiento que generalmente duran unos pocos minutos, aunque han llegado a prolongarse hasta una hora. En casi todos los casos esta respuesta ocurre entre los 30-90 minutos después de recibir la dosis inicial y está asociada con síntomas premonitorios como mareos, debilidad y sudoración. Aun cuando tal respuesta ocurre, el tratamiento posterior puede ser satisfactorio. Esta reacción exagerada parece estar en relación con la dosis administrada y no con la severidad de la hipertensión. La experiencia clínica recogida hasta el momento indica que la incidencia y severidad de síntomas tempranos de hipotensión pueden ser reducidos mediante una dosis inicial baja, que se irá incrementando con precaución durante la primera y segunda semanas de tratamiento. Como es habitual en la práctica al utilizar agentes hipotensores efectivos, el paciente deberá ser advertido sobre cómo evitar los síntomas debidos a hipotensión ortostática y cuáles deben ser las medidas que se tendrán en cuenta si ellos aparecieran. El paciente deberá ser prevenido para evitar situaciones de las que pudiera resultar dañado a causa de mareos o desvanecimientos durante la iniciación del tratamiento con **MINIPRES***. **REACCIONES ADVERSAS:** Las reacciones más comunes asociadas al tratamiento con **MINIPRES*** son mareos, dolor de cabeza, somnolencia, decaimiento, debilidad, náuseas y palpitaciones. En la generalidad de los casos, los efectos colaterales han desaparecido con la continuación del tratamiento o han sido tolerados sin requerir disminución de dosis.

Pfizer

MEDICINA

BUENOS AIRES

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

— — — —

★ in English

VOL. 41, Nº 2 1981

MARCA DE FABRICA

Motilium
JANSSEN

gastrocinético

información para la prescripción

Definición: La sustancia activa de Motilium es Domperidone (R 33812), una síntesis original de los Laboratorios de Investigación de Janssen Pharmaceutica de Bélgica.

Propiedades: Motilium normaliza la motilidad y el vaciamiento gástrico, careciendo de efectos colaterales, neurológicos o psicotrópicos.

Indicaciones: Trastornos relacionados con una evacuación gástrica deficiente, tales como: distensión abdominal, sensación de plenitud después de las comidas, incapacidad para terminar una comida normal, dolor epigástrico, aerofagia/eructos, pirosis/acidez, regurgitación, náuseas/vómitos y patología funcional pediátrica.

Posología y administración:

Dispepsia

Adultos: Un comprimido o 30 gotas (1ml) 3 veces por día, 15 a 30 minutos antes de las comidas.

Niños: Una gota (0,3 mg) por kilo de peso 3 veces por día, 15 a 30 minutos antes de las comidas.

Dispepsia asociada con náuseas y/o vómitos

Adultos: Dos comprimidos o 60 gotas (2 ml), 3 a 4 veces por día.

Niños: Una gota (0,3 mg) por kilogramo de peso 3 a 4 veces por día.

Ante intolerancia oral o cuadro agudo:
0,1 mg/kilogramo de peso, por vía intramuscular o intravenosa de 1 a 6 veces por día.

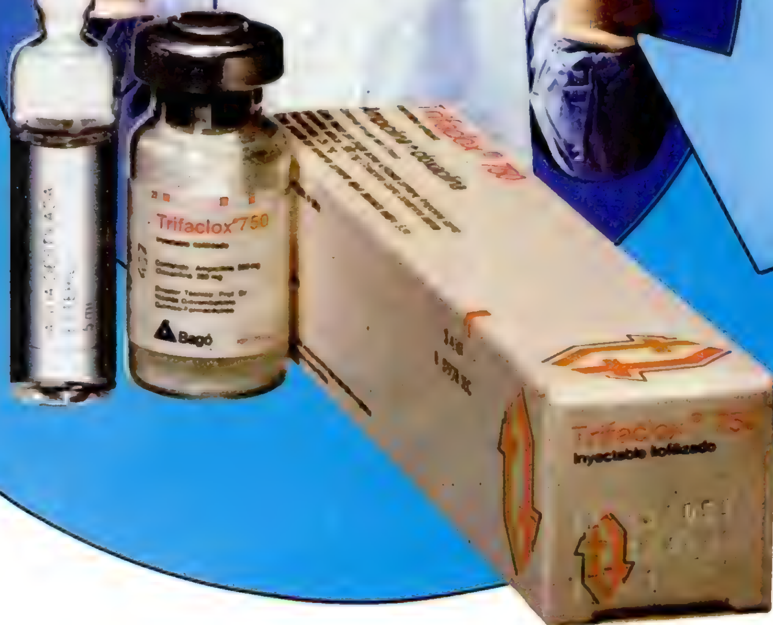
Observaciones: Se aconseja diluir las gotas en algún líquido mezclando bien antes de la administración.

Contraindicaciones: La ausencia de efectos colaterales neurológicos con Motilium es debido al hecho de la casi nula penetración de la droga en la barrera hematoencefálica.
Sin embargo, dado que en los primeros meses de vida las funciones metabólicas y las funciones de la barrera hematoencefálica no están totalmente desarrolladas, la aparición de efectos neurológicos no puede estar totalmente excluida en niños menores de 1 año, por lo que no se aconseja su uso en dicho grupo etario.
A pesar de no haberse observado efectos teratogénicos o embriotóxicos en estudios con animales, se contraindica el uso de Motilium en mujeres embarazadas.

Presentaciones:
Comprimidos: Estuches conteniendo 20 y 40 comprimidos con 10 mg de Domperidone cada uno.
Gotas al 1%: Frasco gotero conteniendo 20 ml con 10 mg de Domperidone/ml (0,3 mg por gota).
Ampollas: Estuche conteniendo 5 ampollas de 2 ml (5 mg de Domperidone/ml).

Producido bajo licencia de
JANSSEN PHARMACEUTICA n.v.
Beerse, Bélgica

Elaborado por
Johnson & Johnson
de Argentina S.A. Comercial e Industrial
Darwin 471 - Buenos Aires



TRIFACLOX
Ampicilina+dicloxacilina
LA TERAPIA BIBACTERICIDA
DE AMPLIA COBERTURA ANTIBIOTICA
Trifaclox 750
Bagó
Trifaclox 750
Inyectable liofilizado
Bagó
Investigación y Tecnología Argentina

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 125-131 (1981)

CONTRIBUCION DE LA ECOCARDIOGRAFIA A LA INDICACION QUIRURGICA EN LA ENDOCARDITIS INFECCIOSA

A. TORINO, J. A. MARTINEZ MARTINEZ, A. BALLESTER, L. D. SUAREZ, A. M. A. PEROSIO

Sección de Cardiología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

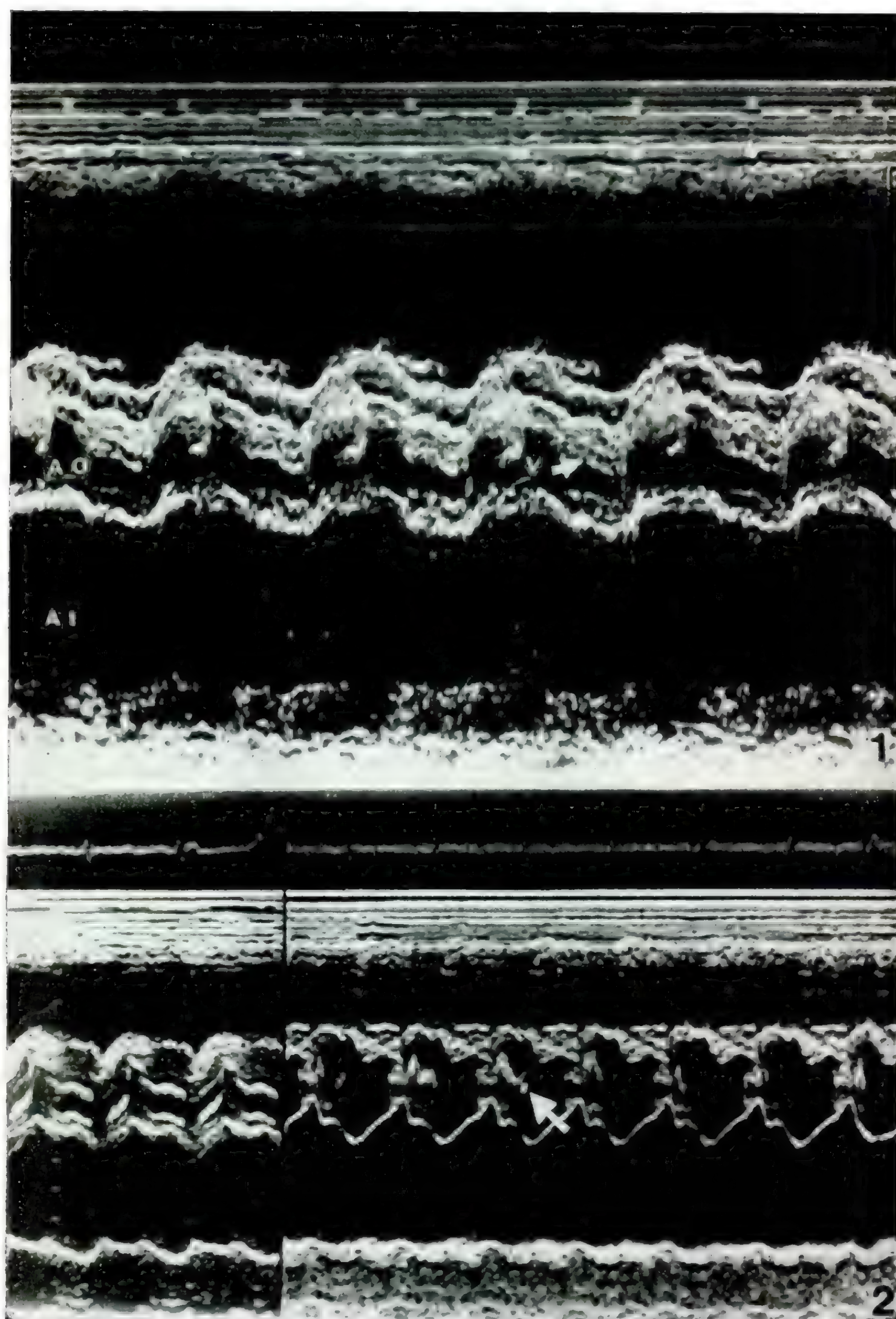
Pese a los últimos progresos médicos en microbiología y terapéutica antibiótica, la endocarditis infecciosa sigue siendo una enfermedad que plantea numerosos aspectos polémicos. Uno de ellos es decidir la indicación quirúrgica y elegir el momento oportuno del reemplazo valvular. Desde 1973 [14] la ecocardiografía en modo M ha demostrado su valor como técnica incruenta en el diagnóstico y evaluación de pacientes con endocarditis infecciosa; detectando vegetaciones, cuantificando la repercusión hemodinámica del daño valvular e identificando algunas complicaciones (ruptura de cuerdas tendinosas, destrucción de sigmoideas aórticas, absceso del anillo aórtico). También ha probado su utilidad al contribuir al diagnóstico de la insuficiencia aórtica grave de comienzo súbito, entidad que requiere reemplazo valvular de urgencia [9, 15]. El objetivo de este trabajo ha sido tratar de establecer el valor que posee la ecocardiografía en modo M, para seleccionar entre los pacientes con endocarditis infecciosa sobre la válvula aórtica, un nuevo grupo de alto riesgo. Este está integrado por enfermos con vegetaciones sobre las sigmoideas aórticas que se continúan formando masas irregulares prolapsantes en el tracto de salida del ventrículo izquierdo, que generan ecos a dicho nivel.

Recibido: 5-III-1980. Aceptado: 3-IX-1980.

Dirección postal: Sección Cardiología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Av. Córdoba 2351, 1120 Buenos Aires, Argentina.

Material y métodos

Desde febrero de 1978 a diciembre de 1979, hemos estudiado 23 pacientes con el diagnóstico clínico de endocarditis infecciosa, basado en los siguientes criterios: 1) síndrome febril; 2) síndrome valvular de reciente aparición o modificaciones del existente; 3) hemocultivos positivos; 4) esplenomegalia; 5) episodios embólicos. Los cuatro primeros estaban presentes en todos los enfermos. De ellos seleccionamos ocho enfermos que en el ecocardiograma en modo M, tenían vegetaciones sobre las válvulas sigmoideas aórticas que se prolapsaban en el tracto de salida del ventrículo izquierdo. La edad promedio del grupo fue 43 años con valores extremos entre 19 y 66 años; seis pertenecían al sexo masculino y dos al femenino. Los ecocardiogramas fueron efectuados con un ecocardiógrafo marca Berger y un Ekoline 20 A con registrador de fibra óptica. Los transductores utilizados fueron de 2.25 y 3.5 Mhz, focalizados a 7.5 cm. Se estudiaron ecocardiográficamente todos los pacientes con la técnica habitual en decúbito dorsal y semidecúbito lateral izquierdo. Se realizaron varios registros durante el período infeccioso y en cada uno se hicieron múltiples barridos de cada válvula cardíaca y del tracto de salida del ventrículo izquierdo. El diagnóstico de vegetaciones se estableció por la presencia de múltiples ecos irregulares sobre las sigmoideas aórticas, tanto en sístole como en diástole [3, 8] y que no limitaban la movilidad valvular (Fig. 1). En todos los casos pudo observarse que esta imagen se continuaba con formaciones o masas irregulares de ecos que prolapsaban delante de la válvula mitral (Fig. 2). Estos hallazgos fueron



Figs. 1-2. — 1, Nivel ultrasónico IV. Ecos densos sobre valvas aórticas en sístole y diástole compatibles con vegetaciones. Ao: aorta; AI: aurícula izquierda; V: vegetaciones. Fotografías realizadas con los negativos de los registros efectuados con registrador continuo; 2, Niveles ultrasónicos III y IV. Por delante de la válvula mitral se observan ecos densos e irregulares prolapsados en el tracto de salida del ventrículo izquierdo (flechas).

TABLA 1. — *Características clínicas*

Paciente	Sexo	Edad	Germen	Embolias	Reemplazo valvular	Muerte
1	M	19	Estrepto. *viridans*	—	Aórtico	no
2	M	44	Estrepto. *viridans*	SNC	Aórtico y mitral	no
3	M	60	Gram neg. No tip.	SNC	—	sí
4	F	57	Estrepto. *viridans*	Mesentérica	—	sí
5	M	30	Estrepto. *viridans*	—	Aórtico	sí
6	M	38	Estafilo. *aureus*	SNC	—	sí
7	F	65	Estrepto. *viridans*	Periférica	Aórtico	no
8	M	66	Estrepto. *bovis*	Periférica	Aórtico	no

SNC: Sistema nervioso central.

siempre confirmados durante la cirugía o mediante la autopsia. La insuficiencia aórtica se catalogó como grave cuando estaban presentes estos criterios: 1) insuficiencia cardíaca [13] grado III-IV; 2) tensión arterial diastólica menor de 60 mm de Hg; 3) soplo de Austin Flint y pulso bisferiens; 4) cardiomegalia radiológica, grado III o IV; 5) sobrecarga auricular y ventricular izquierda en el electrocardiograma; 6) diámetro diastólico ventricular izquierdo mayor de 6.5 cm, en el ecocardiograma; 7) presión de fin de diástole de ventrículo izquierdo elevada y regurgitación aórtica angiográficamente importante en el examen hemodinámico.

Se consideró como insuficiencia aórtica grave de comienzo súbito [9, 10, 15] el cuadro clínico producido por una lesión valvular aórtica muy importante con una regurgitación grave, en un ventrículo izquierdo poco distensible, sin tiempo para adaptarse a la brusca y masiva sobrecarga de volumen. Ello ocasiona: 1) choque de la punta intenso, fugaz, a doble onda; 2) diástole acortada con tercer ruido, soplo de Austin Flint y ruido de cierre precoz de la válvula mitral; 3) apertura retardada y cierre muy precoz de la mitral en el ecocardiograma en modo M [1, 2].

Resultados

De los ocho pacientes seleccionados de acuerdo a los criterios establecidos (Tabla 1), seis presentaron embolias (75 %): tres en el sistema nervioso central, dos en los miembros inferiores y otro en la arteria mesentérica inferior. Todos tenían reiterados hemocultivos positivos. El germen responsable en cinco casos (62.5 %) fue el Estreptococo *viridans*, en un caso (12.5 %) el Estreptococo *bovis*, y en otro el Estafilococo *aureus* (12.5 %) y en el restante un Gram negativo no tipificado. Seis enfermos presentaron el cuadro clínico de la insuficiencia aórtica grave y sólo dos (pacientes 2 y 5, Tabla 1) se catalogaron como insuficiencia aórtica aguda grave. Cinco enfermos (62.5 %) fueron operados previo estudio hemodinámico, por la grave insuficiencia cardíaca que la lesión valvular les había provocado. Todos estaban afebriles en el momento de la intervención, aun cuando tres pacientes no habían completado el tratamiento antibiótico. El lapso entre el comienzo de los síntomas y la operación osciló entre dos y seis meses.

En todos los casos se colocó una prótesis de Bjork-Shiley, con una excepción, en la que se utilizó un modelo de Starr-Edwards. En uno de ellos debido a la importante dilatación del anillo mitral se agregó reemplazo de esa válvula. Un enfermo falleció en el post-operatorio inmediato, mientras que el resto vive con buena capacidad funcional con un seguimiento de tres a catorce meses.

Los tres pacientes (37.5 %) no operados fallecieron, uno a causa de una embolia mesentérica y los otros dos por insuficiencia cardíaca grave; ambos permanecieron sépticos hasta el momento del deceso, el que estuvo precedido por sen-

dos accidentes embólicos en el sistema nervioso central. El intervalo entre el comienzo de los síntomas y la muerte osciló entre un mes y medio y cinco meses. En estos tres pacientes no se realizaron estudios hemodinámicos.

La destrucción valvular y las vegetaciones detectadas por el ecocardiograma fueron confirmadas por la cirugía o por necropsia en los ocho pacientes. Por otra parte, del resto de los hallazgos ecocardiográficos (Tabla 2) los más significativos

TABLA 2. — *Características ecocardiográficas*

Paciente	AI cm	DDRA cm	DDVI cm	DSVI cm	FA %
1	3.0	2.0	7.0	4.0	43
2	4.3	3.2	8.2	4.5	45
3	4.5	5.0	7.0	5.5	21
4	3.0	3.0	7.0	5.0	28
5	4.6	2.0	7.0	4.0	43
6	3.0	2.0	7.0	4.5	35
7	4.5	2.5	6.5	4.0	38
8	3.5	2.0	6.0	3.7	38
X:	3.8	2.7	7.0	4.4	37.6
D.S.:	0.7	1.0	0.5	0.6	7.5

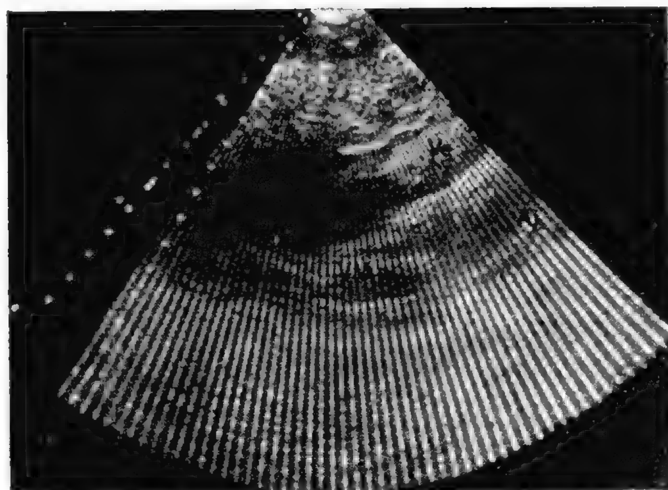
AI: diámetro de la aurícula izquierda; DDRA: diámetro de la aorta; DDVI: ventrículo izquierdo en diastole; DSVI: ventrículo izquierdo en sístole; FA: fracción de acortamiento.

fueron: *a)* diámetro diastólico del ventrículo izquierdo con una media de 7 cm (dilatación moderada); *b)* fracción de acortamiento de 37.6 % ± 7.5, cierre precoz de la mitral en dos casos.

Con respecto a la hemodinámica todos los pacientes tenían: *a)* presión diastólica de fin de lleno superior a 20 mm de Hg; *b)* moderada a grave hipertensión pulmonar, y *c)* buena contractilidad o ligeramente alterada. Ninguno tenían coronariopatía hemodinámicamente significativa (obstrucciones de la luz mayores del 50 % del tronco de la coronaria izquierda y del 75 % de las restantes).

Discusión

Las características ecocardiográficas de las vegetaciones valvulares aórticas, constituidas por múltiples ecos irregulares sumados a las sigmoideas aórticas tanto en sístole como en diástole, fueron descriptas anteriormente [2, 8, 16]. Publicaciones posteriores identificaron a la válvula aórtica destruida por la endocarditis infecciosa [6, 13, 17], por: 1) presencia de vegetaciones sobre las sigmoideas; 2) ecos densos en el tracto de salida del ventrículo izquierdo. En este trabajo, presentamos la evolución clínica de la endocarditis infecciosa sobre sigmoideas aórticas, con vegetaciones diagnosticadas por el ecocardiograma y ecos prolapsantes en el tracto de salida del ventrículo izquierdo. En discordancia con otros autores [11] no pudimos efectuar la separación entre la imagen ecocardiográfica de las vegetaciones prolapsadas de las correspondientes a la válvula destruida. Tampoco pudimos identificar signos que nos permitieran diferenciar entre vegetación activa y cicatrizal [12]. Curiosamente el germen predominante fue el Estreptococo *viridans* (62 %); el Estafilococo más frecuente en otras series [5] ocasionó un solo caso. En todos los pacientes la evolución clínica fue considerada como desfavorable, por la frecuente aparición de accidentes embólicos graves y/o de falla miocárdica que provocó el deceso en el 40 % del grupo. La alta incidencia de los primeros es atribuible a la friabilidad de las masas prolapsantes, constituida por la conjunción de la válvula destruida con vegetaciones y tejido fibrótico como lo evidencia la anatomía patológica (Fig. 3) y probablemente al tamaño de estas formaciones. Esto último no puede ser evaluado en modo M, pero quizás pueda ser precisado con mayor exactitud con la ecocardiografía bidimensional en tiempo real. La insuficiencia cardíaca grave es fundamentalmente consecuencia del importante daño valvular, como lo muestran los resultados hemodinámicos de los pacientes operados. La miocarditis séptica puede ser un factor coadyuvante en algunos casos. Es importante recalcar que la insuficiencia aórtica grave fue el síndrome dominante con una alta incidencia de episodios embólicos. Por otra parte, en el ecocardiograma de todos los enfermos había sobrecarga de volumen [4] del ventrículo izquierdo. Sin embargo, la dilatación de esta cámara fue sólo moderada, lo que es atribuible a la corta evolución de la enfermedad. Los estudios



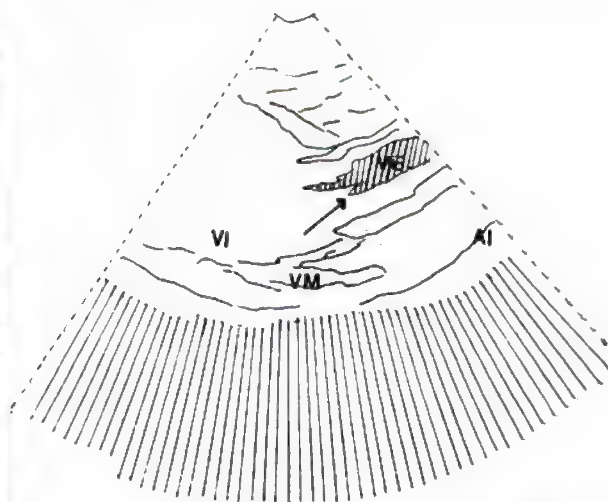


Fig. 3. — Ecocardiograma bidimensional en eje mayor: dentro de la raíz aórtica se observa una masa de ecos correspondientes a la sigmoidea disrupta (flechas). VI ventrículo izquierdo; VE: vegetaciones sumadas a la válvula destruida; VM: válvula mitral; AI: aurícula izquierda.

hemodinámicos, efectuados solamente en los pacientes operados (62.5 %), demostraron siempre valores de la presión de fin de diástole ventricular izquierdo muy elevados pero con contractilidad buena o ligeramente disminuida [7]. Como conclusión, la ecocardiografía en modo M permite seleccionar entre los pacientes con endocarditis infecciosa sobre las válvulas sigmoideas aórticas un nuevo grupo de gran riesgo. Este se une a los ya conocidos (insuficiencia aórtica aguda, absceso del anillo aórtico, etc.) y está integrado por pacientes que muestran ecos sobre las sigmoideas aórticas que se prolongan prolapsando en el tracto de salida del ventrículo izquierdo. Dada su evolución clínica desfavorable en corto plazo, la indicación quirúrgica oportuna parece ser el único tratamiento eficaz en el momento actual.

Resumen

De un grupo de 23 pacientes con endocarditis infecciosa que tenían vegetaciones visibles al ecocardiograma, se seleccionó a ocho pacientes, que tenían vegetaciones sobre las sigmoideas aórticas y masas prolapsantes en el tracto de salida del ventrículo izquierdo. El germen predominante en los hemocultivos fue el Estreptococo viridans *(62 %). Todos los pacientes evolucionaron con insuficiencia cardíaca y con una alta incidencia de embolias (75 %) pese a que el tratamiento antibiótico fue siempre el adecuado. Como consecuencia de estas complicaciones, tres pacientes fallecieron y cinco debieron ser operados. El estudio de la válvula aórtica (necropsia o cirugía) demostró además de las vegetaciones, una importante destrucción de las sigmoideas aórticas. El mal pronóstico de estos pacientes estaría determinado por el importante daño anatómico que implica el hallazgo de masas prolapsantes, donde la indicación quirúrgica oportuna parece ser el único tratamiento eficaz.*

Summary

ECHOCARDIOGRAPHIC CONTRIBUTION TO SURGICAL INDICATION IN INFECTIVE ENDOCARDITIS.

The M-mode echocardiography performed in a group of patients with active endocarditis detected valvular vegetations in 23 of them. Of these, 8 were selected on the basis of the presence of vegetations on the aortic valve leaflets prolonged by prolapsing masses into the left ventricular outflow tract. Six patients were males and two females with an age range between 19 and 66 years (average 43). Streptococcus viridans *could be incriminated as the causal agent in 5 patients. In spite of intensive, early and specific treatment, all patients developed progressive and refractory heart failure and 6 presented thromboembolic episodes (central nervous system: 3 patients, supe-*

rior mesenteric artery: 1 patient, peripheral systemic vascular tree: 2 patients). As a consequence of these complications, 3 patients died between 1 and 5 months after clinical onset of the disease (central nervous system thromboembolism: 2 patients; mesenteric thromboembolism: 1 patient), and the remaining 5 required surgical treatment. In 4 of these, aortic valve replacement was successfully performed (with additional mitral valve replacement in one patient). One patient died in the postoperative period. The anatomic study of the aortic valve was performed in all the patients (at necropsy or during surgery), revealing multiple coarse vegetations (Fig. 3) with severe degree of valvular destruction including acquired fenestrations. In addition, cerebral damage (2 patients) and diffuse mesenteric infarction (1 patient) were corroborated at necropsy. Although further studies are necessary in order to clarify this special evolutive form of infective endocarditis, on the basis of our data, the detection by echocardiography of coarse vegetations on the aortic valve leaflets prolonged in masses into the left ventricle suggests: 1) severe damage of the aortic valve; 2) very negative prognosis, and 3) the need of early surgical treatment.

Addendum.

Posterior a la redacción de este trabajo, se incorporó a nuestra serie la paciente LS (26 años, sexo femenino) con una insuficiencia aórtica grave por endocarditis infecciosa a *Estreptococo viridans.* El ecocardiograma en modo M era similar a los ya descriptos en los demás pacientes. La destrucción valvular se corroboró con el ecocardiograma bidimensional en tiempo real y por la anatomía patológica. La enferma fue operada, se realizó un reemplazo aórtico con remisión total de la sintomatología a los tres meses de la intervención (Fig. 4).

Fig. 4. — Pieza anatómica de la raíz de la aorta. Las flechas indican las vegetaciones adheridas y la sigmoidea izquierda destruida. El compromiso infeccioso es de las tres sigmoideas.

Bibliografía

1. Botvwnick EH, Schiller MW, Wickramasekaran R, Klausner SC, Certz E: Echocardiographic demonstration of early mitral valve closure in severe aortic insufficiency. *Circulation* 51: 836, 1975.
2. Cuesta Silva M, Boskis PF, Binello MM, Lerman J, Torino AF, Boskis B, Perosio AMA: *Ecocardiografía clínica.* Buenos Aires. El Ateneo, 1976.
3. Dillon JC, Feigenbaun H, Honecke LL, Davis R, Chang S: Echocardiographic manifestations of valvular vegetations. *Am J Cardiol* 86: 698, 1973.
4. Feigenbaun H: *Ecocardiografía.* Buenos Aires, Panamericana 1ª edición, 1979.
5. Hurst WJ, Logue BR, Schlant RC, Wenger NK: *The Heart Arteries and Veins.* New York, McGrow-Hill, 6th edition, 1978.
6. Lee CC, Gopal D, Weisler AM: Characteristic echocardiographic manifestations in ruptures aortic valve leaflet (abstr). *Circulation* 49-50: Suppl 3: 144, 1974.
7. Mann T, Mc Laurin L, Grossman W, Craige E: Assessing the hemodynamic severity of acute aortic regurgitation due to infective endocarditis. *New Engl J Med* 293: 108, 1975.
8. Martínez EC, Burch GE, Giles TD: Echocardiographic diagnosis of vegetative aortic bacterial endocarditis. *Am J Cardiol* 34: 845, 1974.
9. Morgenroth J, Perloff J, Zeldis S, Dunkman B: Acute severe aortic regurgitation. *Ann Intern Med* 87: 223, 1977.
10. Pridie RB, Behman R, Oakley CM: Recognition)f aortic regurgitation of recent onset by ultrasound technique. *Am J Cardiol* (abstr) 26: 654, 1970.
11. Ramírez J, Guardiola J, Flowers N: Echocardiographic diagnosis of ruptured aortic valve leaflet in bacterial endocarditis. *Circulation* 57: 634, 1978.
12. Shiu MF, Coltart DJ, Braimbridge MV: Echocardiographic findings in prolapsed aortic cusp with vegetation. *Brit Heart J* 41: 118, 1979.
13. The New York Heart Association Commitee: *Diseases of the heart and blood vessels: Nomenclature and criteria for diagnosis.* Boston, Litle Brown Co., 6th edition, 1964.
14. Wang LS, Dillon JC, Weyman AE, Feigenbaun H: Echocardiography in bacterial endocarditis. *New Engl J Med* 295: 135, 1976.
15. Wigle ED, Labrosse CY: Sudden, severe aortic insufficiency. *Circulation* 32: 708, 1965.
16. Wray TM: The variable echocardiographic features in aortic valve endocarditis. *Circulation* 52: 658, 1975.
17. Wray IM: Echocardiographic manifestations of flail aortic valve leaflets in bacterial endocarditis. *Circulation* 51: 832, 1975

— — — —

Upon this palimpsest of Greek, Latin, and Islamic civilizations, the medical school of Salerno had its beginnings. Although the Benedictine monastery of Monte Cassino was nearby, Salernitan physicians remained remarkably free of clerical control. The school of Salerno was also open to female practitioners and the most famous was the legendary Trotula, presumed author of a treatise on obstetrics. Throughout the early medieval period in Europe, midwifery was generally the province of women while other medical concerns save nursing care were mostly forbidden to them.

En los palimpsestos griegos y latinos y las civilizaciones islámicas tuvo sus orígenes la escuela de Salerno. Aunque el monasterio de los Benedictinos de Monte Cassino estaba cerca, los médicos salertanos permanecieron siempre fuera del control clerical. La escuela de Salerno estaba también abierta a mujeres médicas, y una de las más famosas fue la legendaria Trotula, presuntamente la autora de un tratado de obstetricia. En todo el comienzo del período medieval en Europa, las mujeres podían dedicarse a parteras pero otros quehaceres médicos, excepto la enfermería, les estaban vedados.

Medicine. An Illustrated History.
A. S. Lyons & P. Joseph Petrucelli,
H. M. Abrams Inc., New York, 1978.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 132-136 (1981)

EVALUACION DE LINFOCITOS PERIFERICOS EN PACIENTES CON TUMORES SOLIDOS MALIGNOS

LIA S. RUMI *, ELSIE M. EUGUI, R. L. BALBIANI, ROSA I. BARAÑAO

Instituto de Biología y Medicina Experimental y Hospital del Tórax F. Santojanni, Buenos Aires

La integridad de la respuesta inmune en pacientes con neoplasias malignas ha sido objeto de múltiples controversias. Se ha observado disminución de la hipersensibilidad cutánea a ciertos antígenos de reconocimiento y de contacto, correlacionándolos en algunos casos con ensayos realizados in vitro [5, 13, 15, 16]. El índice de transformación blástica de linfocitos periféricos inducida por mitógenos ha sido ampliamente utilizada como medida de inmunidad mediada por células, tanto en enfermedades linfoproliferativas [4, 8, 12] como en tumores sólidos [2, 7, 18]. La determinación de linfocitos T y B a través del estudio de receptores y marcadores de superficie [19], no ofreció resultados concluyentes [16, 21, 23], habiéndose realizado su exploración principalmente en leucemias, linfomas o en enfermos sometidos a diferentes esquemas de tratamiento [17, 20, 21, 24]. En el presente trabajo se trató de evaluar el porcentaje de linfocitos T y B, en sangre periférica de pacientes con tumores sólidos malignos de distinto origen sin tratamiento previo y con buen estado nutricional; determinándose, además, el porcentaje de linfocitos en distintas etapas de la enfermedad y su relación con el tiempo de sobrevida en cada tipo de neoplasia estudiada.

Material y métodos

Pacientes. Los 32 pacientes estudiados considerando el tipo de tumor y la edad promedio, fueron agrupados en la siguiente forma: *a)* 10 carcinomas de pulmón, edad promedio = 59 ± 2.1; *b)* 8 melanomas, edad promedio = 48.1 ± 5.6; *c)* 10 adenocarcinomas, edad promedio: 62.4 ± 4.7, y *d)* 4 carcinomas epidermoides, edad promedio: 69.3 ± 3.8. Simultáneamente se exploraron 17 controles sanos con edades equivalentes.

Linfocitos. Linfocitos de sangre periférica venosa, fueron obtenidos por gradientes de centrifugación de Ficoll-Hypaque [3]. Las células aisladas se lavaron con solución de Hanks', controlándose su pureza y viabilidad.

Rosetas E. 10^6 linfocitos purificados en 0.25 ml de solución de Hanks' mezclados con 0.25 ml de una suspensión al 1 % de glóbulos rojos de carnero (GRC), se incubaron 15 min a 37° C, luego se centrifugaron a 300 g y posteriormente fueron puestos a 4° C durante toda la noche. Después de esta incubación la mezcla se resuspendió suavemente contando en hemocitómetro un mínimo de 200 células, considerando positivos los linfocitos que habían ligado 3 o más GRC.

Rosetas EAC. 0.1 ml de GRC tratados con hemolisina comercial y suero fresco de ratón (como fuente de complemento) se agregaron a 0.1 ml de linfocitos purificados en una concentración de 5×10^6/ml. La mezcla fue incubada 30 min a 37° C y luego 15 min a 4° C, después de lo cual se resuspendió y la lectura fue realizada en hemocitómetro, considerándose positivos los linfocitos que habían ligado 3 o más GRC.

— — — —

Recibido: 29-X-1980. Aceptado: 10-XII-1980.

* Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Dirección postal: Instituto de Biología y Medicina Experimental, Obligado 2490, 1428 Buenos Aires, Argentina.

Inmunoglobulina de superficie. La determinación de linfocitos con Ig de superficie se realizó utilizando antisuero anti Ig totales (antisuero humano de conejo) conjugado con isotiocinato de fluoresceína. 1×10^6 de linfocitos purificados, lavados con solución de Hanks' y eliminado bien el sobrenadante, se incubaron a 4° C durante 30 min con 0.05 ml de antisuero, después de lo cual se lavaron 3 veces con Hanks' y el pellet se resuspendió en una gota de buffer-glicerina. La lectura se realizó en microscopio de fluorescencia contando con óptica de fase el total de linfocitos y con fluorescencia el total de células con Ig de superficie.

Recuento y porcentaje de linfocitos. El recuento linfocitario se realizó en hemocitómetro, efectuando una dilución 1/20 de sangre entera con ácido acético al 3 %.

El % de linfocitos fue obtenido por recuento de 200 células en extendido de sangre total coloreado según la técnica de May Grünwald-Giemsa.

Resultados

Cáncer de pulmón: Los enfermos afectados de cáncer de pulmón, presentaron valores de rosetas E similares al hallado en los controles normales. El porcentaje de rosetas EAC fue inferior al obtenido en los testigos, aunque no significativamente. Los resultados encontrados, valorando células con inmunoglobulinas de superficie, no presentaron diferencias con el grupo control (Tabla 1). El porcentaje de linfocitos descendió a lo largo de la enfermedad, desde 26.0 antes del tratamiento hasta 9.0 en el período alejado, siendo este grupo de enfermos el que presentó mayores diferencias (Tabla 2).

Melanomas: Los valores porcentuales de rosetas E, rosetas EAC e inmunoglobulinas de superficie fueron en estos pacientes similares a los controles sanos (Tabla 1). El porcentaje de linfocitos durante el período de enfermedad no sufrió variaciones (Tabla 2).

Adenocarcinomas: En este grupo de enfermos no se observó diferencias con los testigos en el porcentaje de rosetas E, que junto con el grupo de carcinomas epidermoides presentaron los valores más altos (52.1 y 54.0, respectivamente). El porcentaje de rosetas EAC fue menor que en los controles sanos ($p < 0.1$ a 0.05). y significativamente inferior al obtenido en los enfermos con melanomas ($p < 0.05$). El porcentaje de células con inmunoglobuli-

TABLA 1. — *Porcentaje de rosetas E, rosetas EAC y células con Ig de superficie en sangre periférica de enfermos y controles normales*

Grupo	% rosetas E	% rosetas EAC	% inmunoglobulinas	Edad
Cáncer de pulmón	44.8 ± 1.0 **a**	13.3 ± 2.2	18.8 ± 2.7	59.0 ± 2.1
Melanomas	41.3 ± 5.8	17.3 ± 1.7 **b**	17.0 ± 1.8	48.1 ± 5.6
Adenocarcinomas	52.1 ± 2.3	10.2 ± 2.9 **b**	13.2 ± 1.5 **c**	62.4 ± 4.7
Carcinoma epidermoide	54.0 ± 0.6	15.7 ± 3.8	20.0 ± 1.9 **d**	69.3 ± 3.8
Testigos	46.7 ± 3.4	16.4 ± 1.6	19.5 ± 2.4 **c**	47.3

a $\bar{X} \pm$ ES; **b** = $p < 0.05$; **c** = $p < 0.05$; **d** = $p < 0.01$.

TABLA 2. — *Porcentaje de linfocitos antes y después del tratamiento antineoplásico*

Tumor	% Linfocitos		
	Antes del tratamiento	Después del 1er. ciclo	Alejado
Cáncer de pulmón	26.0 ± 3.0 **a**	14.7 ± 1.4	9.0 ± 0.58
Melanomas	27.14 ± 2.53	26.9 ± 3.2	27.9 ± 2.3
Adenocarcinomas	22.0 ± 2.0	20.4 ± 2.33	21.33 ± 2.72
Carcinoma epidermoide	26.5 ± 2.9	23.0 ± 2.12	21.5 ± 2.5

a $\bar{X} \pm$ ES.

Tabla 3. — *Relación entre % de linfocitos y sobrevida*

	% de Linfocitos		
	8 - 10	11 - 20	21 - 35
Meses de sobrevida	7.0 ± 0.7 a	15.5 ± 3.5	22.4 ± 2.8

a $\bar{X}$ ± ES.

nas de superficie fue inferior al del grupo control ($p < 0.05$) y al encontrado en los enfermos con adenocarcinomas ($p < 0.01$) (Tabla 1).

Los valores porcentuales de linfocitos no se alteraron con el curso de la enfermedad (Tabla 2).

Carcinomas epidermoides: Los resultados obtenidos en el porcentual de rosetas E, rosetas EAC e Ig de superficie, fueron similares a los hallados en los testigos sanos (Tabla 1). El porcentaje de linfocitos durante la enfermedad, disminuyó desde 26.5 antes del tratamiento hasta 21.5 en el período alejado (Tabla 2).

Porcentaje de linfocitos y sobrevida: La Tabla 3 muestra la relación directa observada entre el porcentaje de linfocitos en el período alejado del tratamiento y el tiempo de sobrevida, en el total de enfermos estudiados.

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, nos permiten observar una disminución del porcentaje de linfocitos con Ig de superficie y de células con receptor para el complemento en enfermos afectados de adenocarcinomas. Estos datos pueden correlacionarse con los publicados por Wood y col.[25], quienes encontraron niveles disminuidos de linfocitos B, en pacientes con tumores sólidos de distinto origen, en ausencia o presencia de tratamientos específicos. Sin embargo, otros autores demuestran incremento de linfocitos B en pacientes de Hodgkin[10] y en enfermos con cáncer de mama[21], después de ser tratados con radioterapia. Se ha postulado que las poblaciones de células con receptor para el complemento poseen actividad citotóxica, la cual puede ser inhibida por linfocitos que forman rosetas espontáneas con GRC[11, 26]. El porcentaje de linfocitos T medido por la capacidad de estas células para ligar GRC, no sufrió variaciones en ninguno de los grupos estudiados por nosotros. Mientras algunos autores describen niveles descendidos de rosetas E en pacientes con tumores varios[24], cáncer de vejiga[9] y cáncer de mama[23] otros, en cambio, no encuentran variaciones[16]. Whithehead y col.[22], demuestran que la metodología utilizada en la exploración de rosetas E es de fundamental importancia. Las mayores diferencias las obtuvieron con incubaciones durante 90 minutos a 4° C, mientras que la incubación a 4° durante la noche homologó los resultados. La utilización de otras metodologías como el cultivo in vitro de linfocitos con mitógenos, no proporcionó datos concluyentes[13]. Rees y col.[18] y Dalbow y col.[7] encuentran disminución de la estimulación blástica y correlación con otros parámetros en enfermos con cáncer de pulmón, pero Barnes y col.[2] estudiando el mismo tipo de enfermos no encontraron diferencias entre éstos y los controles normales. El porcentaje de linfocitos medido a lo largo del proceso neoplásico, no ofreció en nuestros pacientes diferencias importantes, excepto en los enfermos con cáncer de pulmón. La disminución observada pudo estar relacionada con el tipo de tumor o con el tratamiento quimioterápico utilizado. Bainbridge y col.[1] encuentran niveles bajos de linfocitos en enfermos con cáncer de mama en estadío 2 y correlacionan este hecho con mal pronóstico. Otros autores no encuentran diferencias en el número de linfocitos[6] entre enfermos y controles, pero sí las observan en el número total de leucocitos[6, 14].

Nuestros estudios y los realizados por otros investigadores sugieren que no existen alteraciones generalizadas en las distintas poblaciones de linfocitos de enfer-

mos con neoplasias malignas, evaluadas a través de ciertos marcadores de superficie. Sólo pudieron observarse modificaciones parciales cuya interpretación no tiene connotaciones prácticas en el momento actual.

Resumen

Mediante la identificación de diferentes poblaciones de linfocitos periféricos, se realizó un estudio comparativo entre 32 pacientes con neoplasias sólidas malignas de distinto origen, sin tratamiento oncológico previo y 17 controles sanos. Para su evaluación se utilizaron las técnicas de formación de rosetas espontáneas con glóbulos rojos de carnero (rosetas E) para linfocitos T, de rosetas EAC para células con receptor para el complemento, y de inmunofluorescencia directa para linfocitos con Ig de superficie. Además, se valoró el número total de leucocitos y el porcentaje de linfocitos antes y después del tratamiento antineoplásico instituido. Los valores correspondientes al % de rosetas E, no mostraron diferencias entre los distintos grupos de enfermos ni con relación a los controles normales. Con respecto al % de rosetas EAC no se observaron diferencias entre los testigos y los distintos grupos de enfermos estudiados, aunque sí pudieron advertirse entre los pacientes con adenocarcinomas y los portadores de melanomas ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos en el estudio de células con Ig de superficie, mostraron diferencias entre los enfermos con adenocarcinomas y los testigos sanos, y con el grupo de Ca epidermoide. El % de linfocitos antes y después del tratamiento, fue similar en los enfermos con melanomas, adenocarcinomas y carcinomas epidermoides, pero disminuyó sensiblemente en el grupo con cáncer de pulmón, estimándose que ese porcentaje durante la enfermedad, estaba en relación directa con el período de sobrevida de los pacientes.

Summary

EVALUATION OF PERIPHERAL LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH SOLID MALIGNANT TUMORS.

Through the identification of the different populations of peripheral lymphocytes, a study was performed comparing 32 patients with solid malignant tumors of different origin, without previous oncologic treatment, and 17 healthy controls. For this evaluation we utilized the techniques for spontaneous rosette forming cells (T lymphocytes), EAC rosettes for the receptors of complement activated cells, and direct immunofluorescence for surface immunoglobulin bearing cells (B lymphocytes). The total number of leucocytes was evaluated as well as the percentage of lymphocytes before and after antineoplastic treatment. The corresponding values of E rosettes, did not show any difference between the different groups of patients and the normal controls. No difference was observed between the EAC rosette values of healthy donors and of the four groups of patients although a difference between patients with adenocarcinomas and melanomas ($p < 0.05$) was observed. The results of the study showed differences between patients with adenocarcinomas and healthy donors and the epidermal carcinoma group. The percentage of lymphocytes pre and post treatment did not show differences in the patients with melanomas, adenocarcinomas and epidermal carcinomas, but showed a noticeable decrease in the group suffering from lung cancer, thus establishing that the percentage of lymphocytes was in direct relation to the period of survival of these patients.

Bibliografía

1. Bainbridge ET, Ford CHJ, Newman CE: Total lymphocyte-counts in breast cancer. *Lancet* 1: 1203, 1978.
2. Barnes EW, Farmer A, Penhale WJ, Irvine WJ, Roscoe P, Horne NW: Phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation in newly presenting patients with primary carcinoma of the lung. *Cancer* 36: 187, 1975.
3. Carosella ED, Mochanko K, Braun M: Rosette-forming T cells in human peripheral blood at different ages. *Cell Immunol* 12: 323, 1974.
4. Case DC Jr, Hansen JA, Corrales E, Young CW, Dupont B, Pinsky CM, Good RA: Depressed in vitro lymphocyte responses to PHA in patients with Hodgkin disease in continuous long remissions. *Blood* 49: 771, 1977.
5. Catalona WJ, Taylor PT, Rabson AS, Chretien PB: A method for dinitrochlorobenzene

contact sensitization. A clinicopathological study. *N Engl J Med* 286: 399, 1972.
6. Check IJ, Demeester T, Vardiman J, Hunter RL: Differential counts and survival in lung cancer. *Lancet* 2: 1317, 1978.
7. Dalbow MH, Concannon JP, Eng CP, Weil CS, Conway J, Nambisan PTN: Lymphocyte mitogen stimulation studies for patients with lung cancer: evaluation of prognostic significance of preirradiation therapy studies. *J Lab Clin Med* 90: 295, 1977.
8. De Vita VT Jr: Lymphocyte reactivity in Hodgkin's disease: A lymphocyte civil war. *N Engl J Med* 289: 801, 1973.
9. El-Asfahani AMA, Hammouda F, Tawfik H N, Sherif M, Ibrahim AS, Higashi GI, Daw M, Safwat M, Barth RF: Thymus-derived lymphocytes in patients with bilharzial urinary bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 59: 355, 1977.
10. Engeset A, Fröland SS, Bremer K, Høst H: Blood lymphocytes in Hodgkin's disease. Increase of B-lymphocytes following extended field irradiation. *Scand J Haemat* 11: 195, 1973.
11. Fudenberg HH, Smith CL: Human lymphocyte subpopulations and metastatic neoplasia. *N Engl J Med* 297: 162, 1977.
12. Gajl-Peczalska K, Hansen JA, Bloomfield CD, Good RA: B lymphocytes in untreated patients with malignant lymphoma and Hodgkin's disease. *J Clin Invest* 52: 3064, 1973.
13. Golub SH, O'Connell TX, Morton DL: Correlation of in vivo and in vitro assays of immunocompetence in cancer patients. *Cancer Res* 34: 1833, 1974.
14. Huhti E, Poukkula Anneli, Saloheimo M: Leucocyte-counts and survival in lung cancer. *Lancet* 1: 1348, 1979.
15. Johnson MW, Maibach HI, Salmon SE: Skin reactivity in patients with cancer. Impaired delayed hypersensitivity or faulty inflammatory response? *N Engl J Med* 284: 1255, 1971.
16. Nemoto T, Han T, Minowada J, Angkur V, Chamberlain Alice, Dao TLL: Cell-mediated immune status of breast cancer patients: Evaluation by skin tests, lymphocyte stimulation, and counts of rosette-forming cells. *J Natl Cancer Inst* 53: 641, 1974.
17. Papamichail M, Holborow EJ, Keith HI, Currey HLF: Subpopulations of human peripheral blood lymphocytes distinguished by combined rosette formation and membrane immunofluorescence. *Lancet* 2: 64, 1972.
18. Rees JC, Rossio JJ, Wilson HE, Minton JP, Dodd MC: Cellular immunity in neoplasia. *Cancer* 36: 2010, 1975.
19. Roos GD: Identification of human lymphocyte subpopulations by surface marker analysis. *Blood* 53: 799, 1979.
20. Sen L, Borella L: Expression of cell surface markers on T and B lymphocytes after long-term chemotherapy of acute leukemia. *Cell Immunol* 9: 84, 1973.
21. Stjernsward J, Vanky F, Jondal M, Wigzell H, Sealy R: Lymphopenia and change in distribution of human B and T lymphocytes in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma. *Lancet* 1: 1352, 1972.
22. Whitehead RH, Roberts GP, Hughes LE, Thatcher J: Importance of methodology in demonstrating depression of T-lymphocyte levels. *Br J Cancer* 37: 28, 1978.
23. Whitehead RH, Thatcher J, Teasdale C, Roberts GP, Hughes LE: T and B lymphocytes in breast cancer stage relationship and abrogation of T-lymphocyte depression by enzyme treatment in vitro. *Lancet* 2: 330, 1976.
24. Wybran J, Fudenberg HH: Thymus-derived rosette-forming cells in various human disease states: Cancer, lymphoma, bacterial and viral infections, and other diseases. *J Clin Invest* 52: 1026, 1973.
25. Wood GW, Neff JR: A reevaluation of B-lymphocyte levels in peripheral blood from cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 61: 715, 1978.
26. Yu A, Watts H, Jaffe N, Parkman R: Concomitant presence of tumor-specific cytotoxic and inhibitor lymphocytes in patients with osteogenic sarcoma. *N Engl J Med* 297: 121, 1977.

— — — —

L' éloquence continue ennuie.

La elocuencia continuada aburre.

BLAISE PASCAL (1623-1662)

Pensées.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 137-145 (1981)

COMPLICACIONES NEUROLOGICAS TARDIAS DE LA FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA

M. O. MELCON, E. HERSKOVITS

Centro de Investigaciones y Tratamiento de la Fiebre Hemorrágica Argentina, Junín, Provincia de Buenos Aires

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) es una enfermedad infecciosa endemo-epidémica producida por un arenavirus, el virus Junin, y limitada a las zonas agrícolo-ganaderas del sector centro-oeste de la República Argentina [2, 7, 9, 14]. Su cuadro clínico, agentes transmisores y diagnóstico ya han sido exhaustivamente publicados por otros autores [3, 8, 13, 15, 17-19] por lo cual haremos mención solamente a las manifestaciones neurológicas de la FHA. Los signos neurológicos están presentes en mayor o menor grado en todas las formas clínicas y ellos son: temblor en lengua y manos, alteraciones en la estación de pie y marcha, hiperestesia cutánea, dolor a la compresión de masas musculares; hipotonía muscular, hipo o arreflexia propioceptiva, reflejo palmomentoniano positivo; ocasionalmente hiperreflexia; oscilaciones en el nivel de conciencia; trastornos oculares, etc. Esto se aprecia tanto en la forma clínica común, en la forma tífico-nerviosa, y con mayor intensidad, en la forma meningo-encefálica y cuya aparición no es inicial. La observación de un cuadro neurológico tardío en pacientes que habían padecido FHA, que en el medio endemo-epidémico es conocida como "recaída o segunda onda", motiva la realización de este trabajo ya que no hay publicaciones al respecto ni tampoco se ha descripto adecuadamente el aspecto neurológico de esta forma clínica.

Material y métodos

Se estudió un grupo de 21 enfermos, los que fueron atendidos en el Centro de Investigación y Tratamiento de la FHA de Junín. Se trataba de 20 hombres y 1 mujer cuyas edades oscilaban entre los 4 y 61 años con un promedio de 30 años. Todos estos pacientes vivían en Junín y su área de influencia, residiendo en áreas rurales o trabajando en áreas rurales todos ellos. Fueron internados en el Hospital Zonal General de Agudos de Junín o en el Sanatorio Junín S.A., donde permanecieron entre 15 y 60 días.

Durante su internación se los examinó desde un punto de vista clínico general y neurológico diariamente. Las formas clínicas de FHA que precedieron al cuadro neurológico en estudio fueron: forma leve: 2 pacientes; forma común: 17 pacientes; forma tífico-nerviosa: 2 pacientes.

Estos enfermos no presentaban en su historia personal otros antecedentes que sugirieran enfermedades neurológicas; por otro lado, se trataba en general de trabajadores en actividad de edad media o jóvenes. Los adultos de este grupo consumían bebidas alcohólicas dentro de los conceptos considerados normales, salvo uno de ellos (caso 21) al cual se lo conocía como un bebedor habitual. Ninguno de los pacientes era diabético.

Los enfermos fueron vistos diariamente durante su internación y posteriormente controlados en consultorio externo una vez al mes por un mínimo de 6 meses; muchos de ellos continúan en control más esporádico ya por los 5 años. Otros 10 enfermos fueron desechados de este estudio por no haber sido examinados neurológicamente desde un principio, por no conocer los antecedentes perso-

Recibido: 21-V-1980. Aceptado: 11-XI-1980.

Dirección postal: Hospital J. A. Fernández, Unidad de Neurología, Bulnes y Cerviño, 1425 Buenos Aires, Argentina.

nales adecuadamente; por no haberse cumpletado el estudio de laboratorio.

Se realizaron en los 21 pacientes, los siguientes estudios: 1) Laboratorio de rutina. Medio interno. Recuento de plaquetas. Enzimas. Estudio serológico. 2) Electroencefalograma al principio y al final de la internación y a los 3 meses. Luego ocasionalmente. 3) Punción lumbar con manometría y estudio citoquímico del LCR al comienzo de la enfermedad. 4) Tomografía computada cerebral (en 6 pacientes). 5) Inmunoelectroforesis tanto en sangre como en LCR, valorando las distintas fracciones cualitativa y cuantitativamente por inmuno difusión radial [11, 12].

Resultados

La observación de un grupo de 21 enfermos que habían padecido FHA y que posteriormente desarrollaban un cuadro básicamente neurológico, llamó siempre la atención de uno de los autores (M. O. Melcon), quien consignó los hechos más importantes, posibilitando la mejor identificación de esta forma clínica neurológica tardía (también denominada "recaída o segunda onda") y que representa aproximadamente el 10 al 30 % de la totalidad de los enfermos de FHA, según surge de la experiencia personal de los autores, ya que no hay referencias publicadas en este aspecto.

Sus características son las siguientes:

- Pacientes que han sufrido una FHA generalmente en su forma clínica común o leve, cuya duración es de una o dos semanas, con restitución total y generalmente dados de alta asintomáticos.
- Aparición de un síndrome neurológico entre la 3ª y 5ª semana de iniciada su enfermedad (FHA) cuya máxima incidencia se observa entre los 25 y 30 días, aunque sin embargo es posible ver casos hasta los 90 días de iniciada la misma.

Para facilitar la comprensión de los casos, se confecciona la Tabla 1.

TABLA 1

Paciente	Sexo	Edad	Forma clínica	2ª onda a los días	Examen neurológico	EE grama	LCR	Evolución
1. F.R.	♂	16	Leve	29	Fiebre. Hipotonía muscular. S. piramidal. Palmomentoniano. Diplopia.	Anormal: leve	35 células a pred. mononucleares. 0.80 de albúmina.	Buena. Sin secuelas en 60 días.
2. G.I.	♂	6	Leve	25	Fiebre. Hipotonía e hipotrofia muscular. S. cerebeloso. Diplopia.			Buena. Sin secuelas en 30 días.
3. F.A.	♂	51	Tífica común	28	Hipotonía e hipotrofia muscular. Hiporreflexia. S. cerebeloso. Disestesia. Disartría. Palmomentoniano.	Anormal: leve	90 células a pred. mononucleares.	Buena. Sin secuelas en 60 días.
4. L.G.	♂	42	Tífica común	29	Cefalea. Hipotonía e hipotrofia muscular. Hiporreflexia. Disartría. Palmomentoniano.	Anormal: moderado	Normal	Buena. Sin secuelas en 60 días.
5. O.S.	♂	23	Tífica común	23	Cefalea. Hipotonía e hipotrofia muscular. S. cerebeloso. S. piramidal. Palmomentoniano. Disartría.	Anormal: leve	Normal	Buena. Sin secuelas en 60 días.
6. M.J.	♂	51	Tífica nerviosa	30	Fiebre. S. meníngeo. Hipotonía. Hipotrofia. Hiporreflexia. S. cerebeloso. Palmomentoniano. Disestesias. Pares craneanos.	Anormal: moderado	70 células a pred. mononucleares.	Buena. Con leve secuela cerebelosa.

TABLA 1. — *Continuación*

Paciente	Sexo	Edad	Forma clínica	2ª onda a los días	Examen neurológico	EE grama	LCR	Evolución
7. R.A.	♂	36	Tífica común	20	Fiebre. Hipotonía. Hipotrofia. Hiporreflexia. S. cerebeloso. Neuritis óptica.	Anormal: leve	90 células a pred. mononucleares.	Buena. Con leve secuela: Disminución Ag/visual.
8. R.G.	♂	4	Tífica común	25	Fiebre. S. cerebeloso. S. piramidal. Diplopía. Disartría.	Anormal: moderado	96 células a pred. mononucleares.	Buena. Sin secuelas en 30 días.
9. G.C.	♂	9	Tífica común	30	Fiebre. Hipotonía. S. cerebeloso. Palmomentoniano. S. extrapiramidal. S. piramidal.	Anormal: moderado	59 células a pred. mononucleares.	Buena. Con secuela leve: Trast. aprendizaje.
10. N.A.	♂	9	Tífica común	50	Fiebre. S. meníngeo. S. cerebeloso. S. extrapiramidal.	Anormal: moderado	56 células a pred. mononucleares.	Buena. Sin secuelas en 60 días.
11. B.A.	♂	50	Tífica común	25	S. cerebeloso. Disartría. Diplopía. Pares craneanos.	Anormal: leve	Normal	Buena. Con secuela: Hipoacucias bilateral.
12. B.J.	♂	27	Tífica común	25	S. cerebeloso. Diplopía. Pares craneanos. Disartría.			Buena. Con secuela: Disartría.
13. A.C.	♀	42	Tífica común	25	Hipotonía. Hipotrofia e hiporreflexia. Diplopía. Pares craneanos. S. extrapiramidal. Parálisis ciático poplíteo externo.			Fallece a los 30 días por trastornos respiratorios.
14. L.R.	♂	29	Tífica común	90	Fiebre. Cefalea. Vértigo. Disartría. Sínd. paleo y neocerebeloso. Sínd. meníngeo mínimo. Hipotonía muscular. Hiporreflexia. Hiperestesia cutánea. A los 15 días de iniciada recaída se acentúa ataxia de tronco nistagnus y disartría. A los 20 días delirio alucinatorio y megalomanía. TC normal.	Difusamente desorganizado y ligeramente lento.	15 cel a monon Alb 0.53	Buena. A los 90 días se reintegra a sus tareas de campo.
15. S.L.	♂	46	Tífica común	60	Fiebre. Disartría. Meningoencefalitis. VI par izq. Nistagmus horizontal. Palmomentoniano. Hipoacusia. Hemiparesia derecha. Hipotonía. Hiporreflexia, rueda dentada. Mejoría franca. A la semana y afebril, reaparece estado confusional y se acentúan signos de ingreso. VI completo, hemiparesia de franca acentuada rigidez y notable temblor extrapiramidal. (b) Ausencia cut. abd. Hiporreflexia. Hipotrofia. Hipotonía. Sínd. neo y paleocerebeloso. TC normal.	Acentuada lentificación generalizada Ondas lentos delta irregulares y de alto voltaje bilateralmente.	56 cel a monon Alb normal	Buena. A los 10 meses persiste ligera rigidez extrapiramidal, vértigo posicional sínd. cerebeloso hipoacusia con mayor componente perceptivo, dolorimiento y cansancio fácil.

TABLA 1. — *Continuación*

Paciente	Sexo	Edad	Forma clínica	2ª onda a los días	Examen neurológico	EE grama	LCR	Evolución
16. C.Y.	♂	30	T. nerviosa (meningoencefalitis)	40	Fiebre. Disartría. Vértigo. Vómitos. Diplopía. Est. confusional. Arreflexia. Hipotonía e hipotrofia muscular acentuada. Sínd. paleo y neocerebeloso VI par izq.	Desorganización y considerable lentificación bilateral.	27 cel a monon Alb 0.59 Aumento de IgG	Buena. A los 90 días persiste ↓ Ag/v disartria asinergia de tronco nistagmus astenia.
17. C.R.	♂	17	Tífica común	23	Cefalea. Vértigo. Diplopía. Vómitos. Disartría. Sínd. paleo y neocerebeloso. Hiperreflexia.	Desorganizado y ligera lentificación difusa.		Buena. A los 90 días persiste algún mareo cansancio y ↓ rend. laboral.
18. Ch.A.	♂	17	Tífica común	22	Cefalea. Vértigo. Hiporreflexia. Hipotonía. Sínd. paleocerebeloso.	Normal.	Normal.	Buena. A los 30 días sin secuelas.
19. D.L.	♂	27	Tífica común	30	Cefalea. Fiebre. Vértigo. Vómitos. Disartría. Diplopía. Sínd. paleo y neocerebeloso. Hiporreflexia generalizada. Hipotonía. Hipotrofia marcada. Hemiparesia derecha. Temblor extrapiramidal (b).	Difusamente desorganizado. Leve lentificación bilateral.		Buena. A los 60 días persiste mareos y cansancio fácil. A los 90 días. Normal.
20. R.D.	♂	61	Tífica común	26	Fiebre. Disartría. Mareos. Diplopía. Estado confusional. Sínd. paleo y neocerebeloso. Ausencia cutánea abd. Hipotonía. Hipotrofia. Hiporreflexia (neumopatía base izq.). Palmomentoniano (b).	Marcada lentificación bilateral. Ondas lentas, tas, delta de alto voltaje distribuidas en ambos hemisferios.	11 cel a monon Alb normal	Buena. A los 60 días persiste mareos falta de fuerzas y asinergia de tronco.
21. A.M.	♂	53	Tífica común	26	Febril. Meningoencefalitis (estado confusional, excitación psicomotriz, rigidez de nuca). Ausencia cut. abd. Hipotonía. Arreflexia. Hipotrofia marcada. Sínd. paleocerebeloso.		27 cel a monon Alb 0.69 mg Aumento de IgG	Falleció a los 35 días de iniciada la enfermedad por probable insuficiencia hepática aguda. Ictericia, coluria acolia, enzima alta y descenso de colinesterasa.

Los síntomas y signos más importantes fueron: síndrome cerebeloso con signos tanto de paleo como de neocerebelo, es decir, tanto por afectación de vermis como de hemisferios cerebelosos; signos de neuropatía periférica, hipotonía, hipotrofia muscular e hipo o arreflexia generalizada; afectación de pares craneales, dentro de los cuales la diplopía ocupa un lugar preponderante; vértigo y su franca acentuación posicional; el reflejo palmomentoniano, expresión de afectación cortical y sub-cortical difusa; disartría y signos extrapiramidales con notable rigidez y temblor.

Es evidente, como muestran las Figuras 1 y 2, que tanto el síndrome cerebeloso, como los signos de neuropatía periférica y la diplopia, están presentes en la mayoría de los enfermos y representan los signos más frecuentes e importantes. Este cuadro neurológico puede acompañarse de un síndrome febril, aunque con la particu-

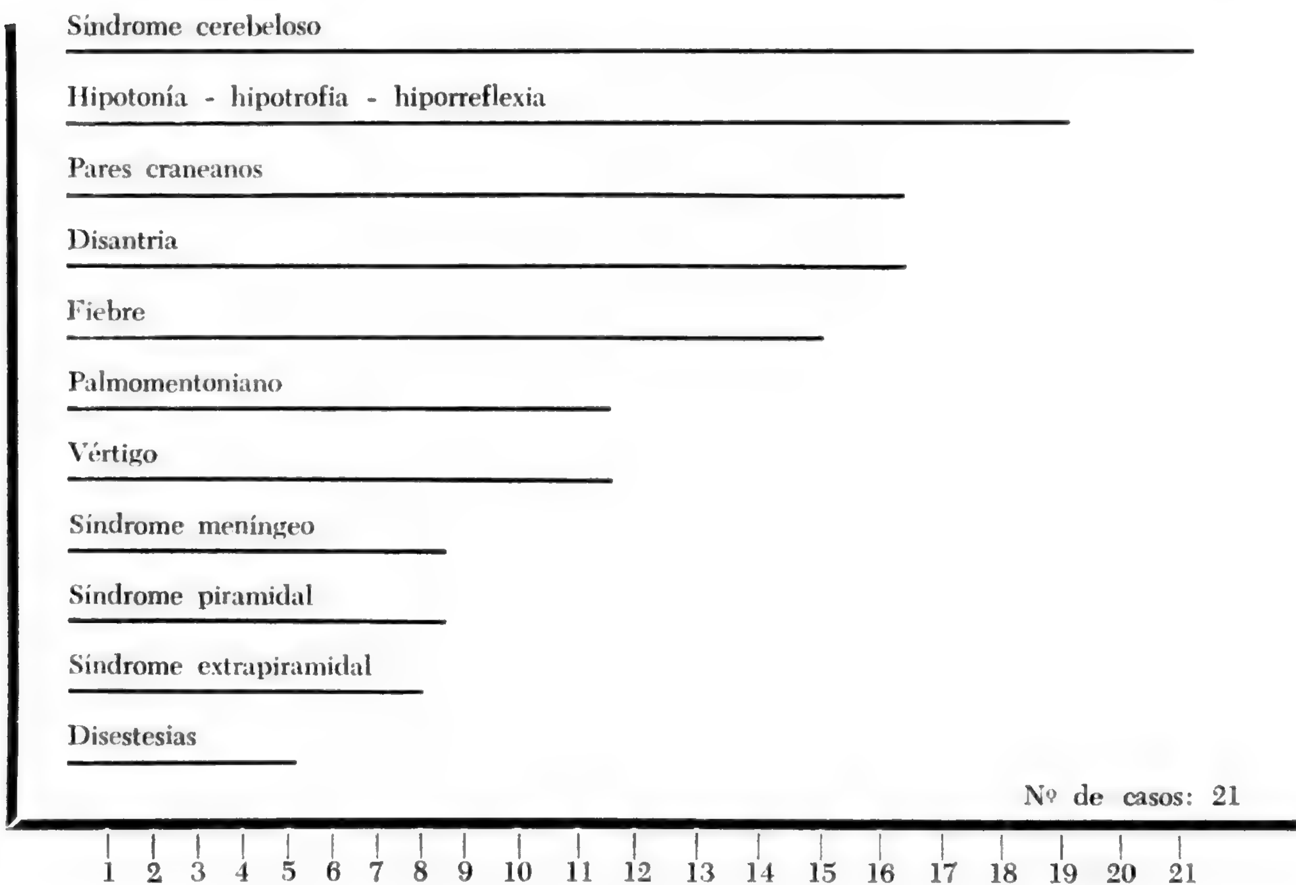


Fig. 1. — Síntomas y signos de la "segunda onda" de la FHA

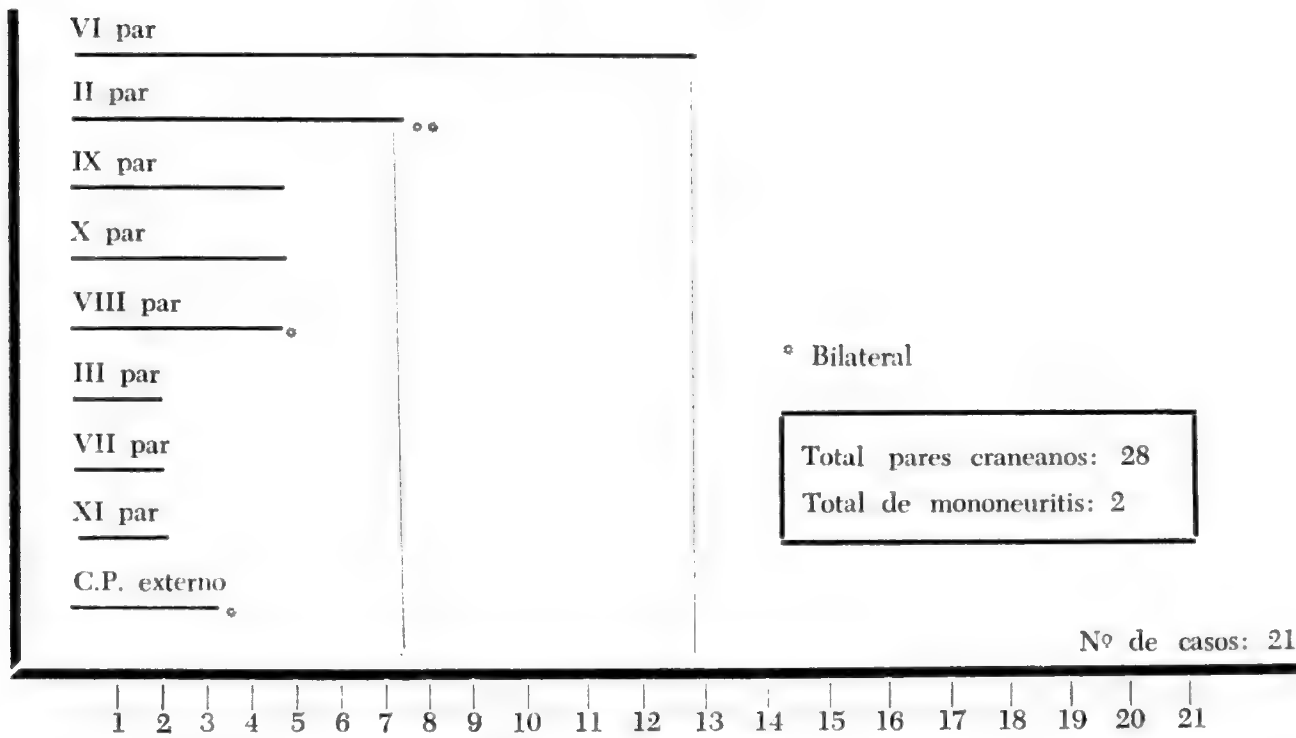


Fig. 2. — Frecuencia de pares craneanos y mononeuritis

laridad de presentar en este momento los exámenes de laboratorio de rutina normales.

Los electroencefalogramas son anormales, variando desde una ligera desorganización hasta una moderada o considerable actividad lenta, difusa y permanente. Las alteraciones son inespecíficas y están desprovistas de anomalías focales francas. La tomografía computada cerebral fue normal en los seis pacientes sometidos a este estudio.

El LCR cristal de roca, es normal o muestra una pleocitosis de alrededor de 100 células a franco predominio de mononucleares. Las proteínas totales son normales o ligeramente aumentadas. La manometría es normal o levemente elevada. La inmunoelectroforesis fue normal tanto en sangre como en LCR en la mayoría de estos enfermos, salvo en tres casos que mostraron un aumento de la IgG en LCR. En la Figura 3 se aprecia el aumento de IgG y la alteración de la relación Alb/IgG.

La evolución de esta "recaída o segunda onda" es habitualmente buena, con desaparición de la signología entre los 15 y 90 días, aunque hay casos con tiempo de recuperación más prolongados, otros quedan con secuelas y algunos son fatales (ver Tabla 1).

Se han utilizado corticoides para su tratamiento con un resultado aparentemente beneficioso.

Las secuelas fueron: inestabilidad en la marcha, vértigo, disminución de agudeza visual, hipoacusia mixta bilateral, disartria, signos cerebelosos, extrapiramidales, cansancio fácil y menor rendimiento laboral.

En este grupo de pacientes hubo dos fallecidos, uno de ellos (caso 13) por trastornos respiratorios y por afectación de los últimos pares craneales y el otro (caso 21), quien tenía antecedentes alcohólicos, cuya causa de fallecimiento fue por una insuficiencia hepática aguda, pero que a su ingreso, los exámenes de laboratorio fueron normales.

Discusión

Dentro de las infecciones por Arenavirus (virus Junin, Lassa, Tacaribe, Coriomeningitis Linfocitaria y Fiebre Hemorrágica Boliviana), la FHA es la única que realiza con esta frecuencia una complicación neurológica tardía [2]. La frecuencia de esta recaída es del 10 al 30 % de la totalidad de enfermos de FHA en nuestro medio. Esta "segunda onda" o complicación neurológica tardía, es una forma clínica de una virosis que no es nueva en esta enfermedad, aunque no ha sido comunicada detalladamente [13]. No es nueva en realidad, porque desde hace mucho tiempo se la observa, aunque recién se ha clarificado en estos últimos años en razón de la diferenciación neta entre el cuadro de ingreso y la complicación neurológica tardía.

	Proteínas totales	Albúmina	IgG	IgA	Rel Alb/IgG	Rel Alb/IgG
Promedio normal	34.4 ± 6.1	27.8 ± 8.8	3.6 ± 1.2	1.26 ± 0.5	7.7 ± 0.5	19 ± 2.0
Moine	44.5	28.0	**6.0**	2.10	**4.66**	13.0
Calvet	68	30	**8.90**	1.54	**3.37**	19.4
Arredondo	69	34	**9.20**	1.80	**3.69**	18.8

EXPRESADO EN mg/%

Fig. 3. — Valores comparativos sobre 15 pacientes normales (mg %)

Al comienzo de las grandes epidemias de los años 1958/59 [5, 14] —por ejemplo— los enfermos ingresaban con cuadros sumamente severos, estando una gran parte de ellos internados por largos períodos. En esta larga evolución, algunos hacían su recaída, la que se interpretaba en muchos de ellos como agravaciones de su enfermedad. En la medida que fue disminuyendo la frecuencia y sobre todo la gravedad (cambios ecológicos, anticuerpos en la población, etc.) se hicieron habituales las formas clínicas comunes y leves que requieren internaciones más cortas y permitió la separación de aquellos que regresaban con el cuadro neurológico tardío anteriormente descripto.

Luego de una infección viral, tal como ocurre en el sarampión, varicela, rubeola, gripe, etc., puede aparecer al cabo de días o semanas un síndrome neurológico agudo que puede dar como resultado una severa lesión del SNC y periférico y que no difieren en mucho del cuadro clínico y de laboratorio que estamos hablando; son las denominadas leucoencefalitis post-infecciosas.

La "recaída" o complicación neurológica tardía sería perfectamente equiparable a otras complicaciones virales, ya que tienen en común: *a*) el antecedente de enfermedad viral; *b*) la posterior aparición de un síndrome neurológico agudo; *c*) electroencefalogramas anormales pero inespecíficos; *d*) un LCR con pleocitosis leve o moderada a predominio de mononucleares; una IEF que cuando es anormal tiene proteínas altas e IgG elevada, y *e*) una evolución con características similares, de manera tal que sería lógico hablar y para ubicarla, de "meningoencefalitis post-infecciosa" en este caso, de la FHA. Un cuadro similar ocurre en las "leucoencefalitis post-vaccinales", por ejemplo, el caso de la vacunación antirrábica con las antiguas preparaciones de Pasteur y otras, que contenían mielina y virus vivos atenuados y provocaban en algunos desmielinización e infiltrados perivasculares linfoplasmocitarios [12]. Otro ejemplo es el de las "neuropatías post-infecciosas" por presunto mecanismo autoinmune como el de síndrome de Guillain-Barré.

El aumento de gammaglobulina en LCR de algunos enfermos de FHA con recaídas, se debe posiblemente a su persistencia, ya que la IgG está siempre elevada en el LCR de forma clínicas "nerviosas" de FHA [20]. Esto significaría que el aumento de IgG en LCR de la complicación neurológica tardía, se debe posiblemente a que persiste aún elevada en pacientes que han sufrido una FHA en su forma clínica meningoencefalítica [19, 20]. La elevación de gammaglobulina en LCR es selectiva, seguramente producida localmente en el SNC y representando anticuerpos. Los valores significativamente altos de IgG en LCR de algunas recaídas, apoyaría la relación inmunológica de este proceso.

Es posible que la patogénesis de este cuadro esté ligada a reacciones inmunológicas y siendo la hipersensibilidad retardada la presunta o verdadera causa de la agresión neurológica [6, 20, 21]. Con todos estos elementos precedentes, podemos entonces colocar la complicación neurológica tardía como un elemento importante en el conocimiento de esta enfermedad y que, dada su difusión, es necesario conocer.

Resumen

En los últimos cinco años, tuvimos la oportunidad de observar un grupo de 21 enfermos, que luego de haber padecido una FHA presentaron una complicación neurológica que denominamos "complicación neurológica tardía" y que también es conocida como "recaída o segunda onda". Esta complicación, no suficientemente clarificada, nos ha llevado a la comunicación de este trabajo. Sus características son las siguientes: 1) Pacientes que han sufrido una FHA en su forma clínica común o leve. 2) Aparición de un síndrome neurológico entre la 3ª y 5ª semana y representado fundamentalmente por un síndrome cerebeloso; signos de neuropatía periférica; afectación de pares craneales y siendo también frecuentes los signos de afectación cortical difusa, piramidales y extrapiramidales. Cursa con laboratorio de rutina normal. 3) Los trazados electroencefalográficos fueron anormales, variando desde una ligera desorganización a moderada o considerable actividad lenta difusa

y permanente. Las alteraciones fueron inespecíficas. 4) Las tomografías computadas cerebral realizadas, fueron normales. 5) El LCR cristal de roca, fue normal o mostró ligera o moderada pleocitosis con un franco predominio de mononucleares. Las proteínas totales fueron normales o ligeramente elevadas. 6) La inmunoelectroforesis fue normal, tanto en sangre como en LCR, salvo en tres casos que mostraron aumento de IgG. 7) La evolución de esta "recaída" es habitualmente buena, con desaparición de la signología entre los 15 y 90 días. Hay casos con secuelas y algunos fatales.

Summary

LATE NEUROLOGICAL COMPLICATIONS OF ARGENTINE HEMORRHAGIC FEVER.

A group of 21 patients who had suffered from Argentine Hemorrhagic Fever (AHF) and who after some time presented a neurological syndrome, led to the identification of a late neurological complication, also known as "relapse or second rebound". This group of patients represents 10 % to 30 % of all those who had suffered the disease. The following are some of their characteristics: 1) A very weak AHF, which might have lasted one or two weeks. 2) A neurological syndrome between the 3rd and 5th week after the illness. 3) Striking symptoms and signs as: a) *Cerebellar syndrome;* b) *Signs of peripheral neuropathy such as muscular hypotony, hypotrophy and hypo or generalized arreflexia;* c) *Impairment of cranial nerves (frequently with diplopia);* d) *Vertigo or dizziness;* e) *Palmo-mentoniane reflex;* f) *Dysarthria and extrapyramidal signs with obvious tremor. 4) The EEG were abnormal, varying from a quick disorganization towards a considerably dim, slow and permanent activity. 5) Normal cerebral computarized tomography. 6) Cerebrospinal fluid (CSF) either normal or with an increased number of cells, predominantly mononuclear. Total proteins were either normal or slightly elevated. The manometry was either normal or slightly high. 7) Immunoelectrophoresis was normal in both blood and CSF except for three cases which showed an increase of IgG in the CSF evolution. 8) The evolution of this late neurological complication was usually favorable with disappearance of the symptoms in 15 to 90 days. There were some cases which retained certain disabilities and others which were fatal. 9) Steroids were used in some patients and the results were apparently beneficial. There is a possibility that the pathogenesis of this syndrome might be related to immunological reactions.*

Agradecimiento: Los autores agradecen a los integrantes del Centro de Investigación y Tratamiento de la Fiebre Hemorrágica Argentina de Junín, por haber permitido el estudio neurológico de algunos de los pacientes.

Bibliografía

1. Biquard C, Figini HF, Monteverde DA, Somoza MJ, Alvarez F: Estudio neurológico de 120 casos de Fiebre Hemorrágica Argentina. *Prensa Méd Arg* 55: 605, 1969.
2. Bres P: Importancia de las investigaciones en Fiebres Hemorrágicas producidas por arenavirus. *Medicina (Bs Aires),* 37 supl. 3: 33, 1977.
3. Casals I: Reacciones serológicas con arenavirus. *Medicina (Bs Aires),* 37 Supl. 3: 59, 1977.
4. Figini HA, Melcon MO: Fiebre Hemorrágica Argentina. Secuelas Neurológicas. Actas del III Congreso Panamericano de Neurología, San Pablo, 1970.
5. Greenway DJ, Rugiero HR, Parodi AS: Fiebre Hemorrágica Epidémica. *El Día Médico* 31: 3, 1959.
6. Giovaniello OA, Boxaca MC: Effect of cyclophosphamide on Junin virus infection of mice. *Medicina (Bs Aires)* 33: 368, 1973.
7. Lascano F, Berría MI, Martínez Segovia ZM de: Ultraestructura de los arenavirus. *Medicina (Bs Aires)* 37, Supl. 3: 26, 1977.
8. Maiztegui JL: Fiebre Hemorrágica Argentina. *Medicina (Bs Aires)* 8: 617, 1978.
9. Martínez Segovia ZM de, De Mitri MI, Grau O, Añon MC, Franze-Fernández M T: Estudios bioquímicos del virus Junin. *Medicina (Bs Aires)* 37, Supl. 3: 18, 1977.
10. Melcon MO, Delamónica EA: Estudio electroencefalográfico en la Fiebre Hemorrágica Argentina. *Prensa Méd Arg* 57: 1750, 1970.
11. Milani HL: Comunicación personal.

12. Nagano Y, Davenport F: Rabies (Eds) University of Tokio Press, Tokio, 1971.
13. Ouchterlony O: Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr Allergy* 6: 30, 1962.
14. Parodi AS, Greenway DJ, Rugiero HR, Rivero E, Frigerio MJ, de la Barrera JM, Mettler N, Garzon F, Boxaca M, Guerrero L de, Nota N: Sobre etiología del brote epidémico de Junin. *El Día Médico* 30: 2300, 1958.
15. Rugiero HR, Milani HA, Ruggiero HA, Fernández D, Cintora A, Magnoni C, Giacosa A, Astarloa L, Maglio F, González Cambaceres C, Squassi G: Fiebre Hemorrágica Argentina. Laboratorio Clínico. *Rev Asoc Méd Arg* 78: 611, 1964.
16. Rugiero HR, Parodi AS, Ruggiero HA, Cintora FA, Magnoni C, Milani HA: Síntesis médica sobre Fiebre Hemorrágica Argentina. Publicaciones Ministerio de Salud Pública de la Nación, Buenos Aires, 1965.
17. Rugiero HR, Ruggiero HA, González Cambaceres C, Cintora FA, Maglio F, Magnoni C, Astarloa L, Squassi G: Fiebre Hemorrágica Argentina. Estudio clínico descriptivo. *Rev Asoc Méd Arg* 78: 281, 1964.
18. Rugiero HR, Cintora FA, Magnoni C, Ruggiero HA, González Cambaceres C, Maglio F, Astarloa L, Squassi G: Fiebre Hemorrágica Argentina. Formas clínicas. *Rev Asoc Méd Arg* 78: 500, 1964.
19. Rugiero HR, Cintora FA, Libonatti E, Magnoni C, Castiglione E, Locisero R: Formas nerviosas de la Fiebre Hemorrágica Epidémica. *Prensa Méd Arg* 47: 1845, 1960.
20. Ruggiero HR, Magnoni C, Cintora FA, Milani HA, Pérez Izquierdo F, Barro A: Tratamiento de las formas nerviosas de FHA con drogas inmunosupresoras. *Prensa Méd Arg* 64: 345, 1977.
21. Weissenbacher M, Schmuñis G, Parodi AS: Junin virus multiplication in thymectomized mice. Effect of thymus and immunocompetent cells grafting. *Arch ges Virus forsch* 26: 63, 1969.

— — — —

Yo vi una vez a Oppenheimer contar una anécdota que reveló cómo algunas personas ven ciertos aspectos del futuro de la humanidad. En una reunión internacional un académico soviético le manifestó: "Dentro de unos treinta años, la única actividad posible de los seres humanos será la ciencia, en una u otra forma", y ante los ojos asombrados de Oppenhemier —quien era un gran humanista además de científico— el ruso añadió, rectificando: "Ah sí, siempre habrá alguna persona interesada en el deporte".

Marcel Roche

Descubriendo a Prometeo, Monte Avila, 1975

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 146-152 (1981)

FUNCION CARDIACA EN LA ANEMIA AGUDA NORMOVOLEMICA EXPERIMENTAL

F. FLORENZANO, GABRIELA DIAZ, E. ESCOBAR

Departamentos de Medicina y Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Sede Oriente, Universidad de Chile

La principal consecuencia fisiológica producida por la anemia es una disminución de la capacidad de transporte de oxígeno, al disminuir la concentración de hemoglobina en la sangre. Como mecanismo de compensación, se ha comprobado un aumento del gasto cardíaco, tanto por un aumento de la frecuencia cardíaca como del volumen expulsivo [5-9, 13, 22]. Se ha sugerido que uno de los determinantes principales de este incremento de la función cardíaca lo representa la disminución de la post-carga causada por la disminución de la viscocidad sanguínea [5-8]. Por otro lado, en la anemia aguda en el perro producida por recambio de sangre por dextran de bajo peso molecular, se ha comprobado un aumento del volumen diastólico final del ventrículo izquierdo, y de los índices isovolumétricos y de eyección para estimar la contractilidad, sugiriéndose una contribución tanto del mecanismo de Frank-Starling como de un aumento de la contractilidad en el incremento del volumen expulsivo [16]. Como estos índices de contractilidad no son totalmente independientes de variaciones de la pre y post carga, persiste el interrogante de un aumento real de la contractilidad, lo que es muy difícil de resolver en el animal entero, dados los cambios hemodinámicos periféricos que provoca la anemia. El objetivo del presente trabajo es correlacionar los cambios hemodinámicos producidos por la anemia isovolémica en el gato, con las variaciones de la fuerza contráctil isométrica medida en la preparación del músculo papilar.

Material y métodos

Catorce gatos adultos de ambos sexos (1.7 a 4 kg de peso) fueron anestesiados con Pentobarbital sódico 30 mg/kg intraperitoneal. Se colocaron catéteres de polietileno en ambas arterias femorales, los que fueron conectados a transductores de presión P23DB y P23BB, respectivamente. Se administró heparina 5 mg/kg de peso. Para la determinación del gasto cardíaco se utilizó la inyección de 2.4 mg en 1 ml de verde de indocianina en aurícula derecha, aspirando la sangre arterial a través de Densitómetro Gilford, a 10 ml/min. Cada determinación de gasto cardíaco se efectuó por duplicado. Al término del experimento se realizó curva de calibración con tres concentraciones conocidas del colorante [5]. Las curvas de presión y de dilución de colorante se registraron en Polígrafo Gilson ICM-5. En los 14 animales se hicieron registros basales de presión arterial y de aurícula derecha, de gasto cardíaco y determinación de hematocrito y de gases en sangre arterial.

En siete gatos considerados como controles, se procedió a la remoción rápida del corazón y extracción de los músculos papilares del ventrículo derecho. En los siete restantes gatos, después de los registros basales, y a tórax cerrado, se procedió a recambio de sangre 25 ml/kg por dextran al 6 % en solución salina isotónica, previamente

Recibido: 13-XI-1980. Aceptado: 7-I-1981.

Dirección postal: Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Sede Oriente, Universidad de Chile, Casilla 70 D, Santiago, Chile.

calentada a 37°, recambio que se efectuó en forma lenta, volumen a volumen, procedimiento que tomó 15 min. Después de un período de estabilización de 20 min, se repitieron registros de presiones y gasto cardíaco y extracción de muestras de sangre arterial y hematocrito, procediéndose finalmente a la preparación del músculo papilar del ventrículo derecho.

Los músculos papilares fueron suspendidos en baño con solución Ringer-Locke termorregulado a 37°, con burbujeo fino permanente de mezcla de 95 % de O_2 y 5 % de CO_2. Cada músculo papilar se fijó por uno de sus extremos y se unió al otro a un transductor de fuerza Grass FTO3. Los músculos fueron estimulados eléctricamente con generador Grass S 44, con onda cuadrada de un voltaje de 20 % superior al umbral, de dos milisegundos de duración, con una frecuencia de estimulación de 30 por minuto. La fuerza isométrica desarrollada por el músculo papilar fue registrada en Polígrafo Grass de respuesta rápida, iniciando las mediciones después de lograda la estabilidad de la preparación, lo que ocurrió en un promedio de media hora. Se buscó la longitud óptima (L máx), aplicando una tensión de reposo progresiva. Mediante circuito diferenciador se obtuvo registro de la derivada de la curva de tensión tiempo para el cálculo de la dT/dt máxima. Se corrigió la tensión máxima desarrollada en cada precarga por el área de sección del músculo papilar, en milímetros cuadrados, que se derivó pesando y midiendo la longitud del músculo al final del experimento, asumiendo densidad 1 para el músculo y una forma cilíndrica.

Se utilizó la prueba de t apareada para el análisis estadístico de los datos del grupo de animales antes y después del recambio, y la prueba de t para muestras independientes cuando se compararon con los controles. Los valores de las variables se expresan como promedios ± error standard (E.S.).

Resultados

El peso de los gatos resultó en promedio algo mayor en el grupo sometido a anemia, 2.8 ± 0.2 kg contra 2.4 ± 0.3 en los controles, diferencia que no fue significativa y que, además, no determinó diferencias en el grosor de los músculos papilares siendo los promedios de área de sección para cada grupo de 1.03 ± 0.14 mm^2 y 1.02 ± 0.15 mm^2, respectivamente.

La Tabla 1 resume los valores del hematocrito y de los gases en sangre arterial para el grupo control y el grupo que fue

TABLA 1. — *Valores de hematocrito y gases en sangre arterial en grupo control y en grupo experimental en situación basal y después de producida la anemia* ($\overline{X}$ ± *ES*)

	Control (n = 7)	Grupo experimental (n = 7)	
		Basal	Anemia
Hematocrito	37 ± 1.2	37 ± 1.2	18 ± 1.0 *
pH	7.36 ± 0.02	7.39 ± 0.01	7.38 ± 0.03
pO_2	107 ± 4	99 ± 6	103 ± 6
pCO_2	31.7 ± 1.7	32.4 ± 1.4	35.0 ± 2.0

* $p < 0.001$ (basal versus anemia).

TABLA 2. — *Variables hemodinámicas en grupo control y en grupo experimental en situación basal y después de producida la anemia* (X ± *ES*)

	Control (n = 7)	Grupo experimental (n = 7)	
		Basal	Anemia
Frecuencia cardíaca, lat/min	158 ± 11	176 ± 12	165 ± 13
Presión arterial sistólica, mm Hg	160 ± 12	181 ± 7	186 ± 12
Presión arterial diastólica, mm Hg	114 ± 9	136 ± 7	119 ± 7 **
Presión arterial media, mm Hg	128 ± 8	158 ± 7	149 ± 8 **
Presión aurícula derecha, mm Hg	0 ± 0.22	0.8 ± 0.7	0.5 ± 0.5
Gasto cardíaco, ml/min	237 ± 12	231 ± 20	330 ± 27 **
Volumen expulsivo, ml/lat	1.58 ± 0.21	1.33 ± 0.23	1.98 ± 0.32 *
Resistencia periférica, mm Hg/l/min	555 ± 57	710 ± 103	471 ± 82 ***

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (basal vs anemia).

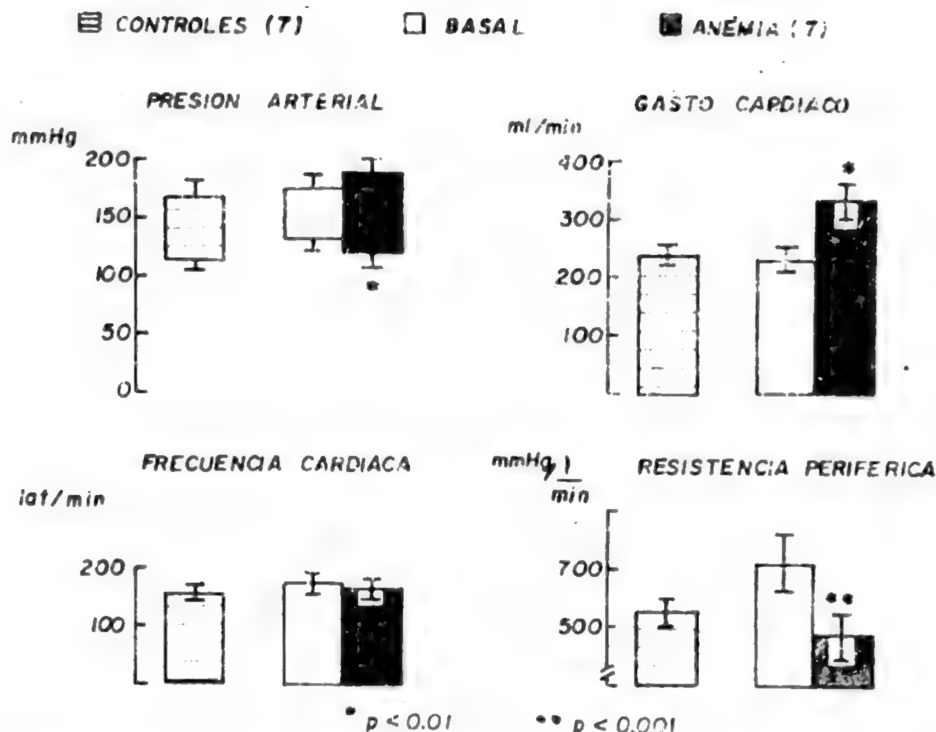


Fig. 1. — Valores promedio ± error standard de variables hemodinámicas en el grupo control (achurado) y el grupo experimental antes (blanco) y después (negro) de producida la anemia.

sometido a recambio de sangre por dextran, con determinación de valores antes y después de producida la anemia. Los valores de hematocrito del grupo control y el valor basal del grupo experimental son iguales, en tanto que después del recambio baja en un 51 % ($p < 0.001$). No se detectaron cambios de significación de los gases en sangre arterial en ninguno de los grupos.

En la Tabla 2 y Figura 1 se observan las variables hemodinámicas registradas en los mismos grupos: no existieron diferencias entre el grupo considerado como control y la situación basal del grupo experimental, con la sola excepción de una menor presión media arterial en el grupo control ($p < 0.05$). En el grupo sometido a recambio, la frecuencia cardíaca no varió, la presión arterial sistólica tuvo un incremento no significativo, en tanto que descendieron la presión arterial diastólica y la media ($p < 0.01$). El gasto cardíaco aumentó en un 43 % ($p < 0.01$), en tanto que el volumen expulsivo lo hizo en un 49 % ($p < 0.05$). La resistencia periférica descendió en un 34 % ($p < 0.001$), y la presión de aurícula derecha no se modificó.

En la Figura 2 se grafica en las ordenadas, la tensión desarrollada por los músculos papilares corregida por el área de sección. La abscisa representa variaciones de la longitud inicial de la fibra (longitud previa a la contracción después de aplicada la precarga). Sus unidades fueron expresadas como porcentaje respecto a la longitud que consiguió el máximo desarrollo de tensión, que llamamos Lmáx.

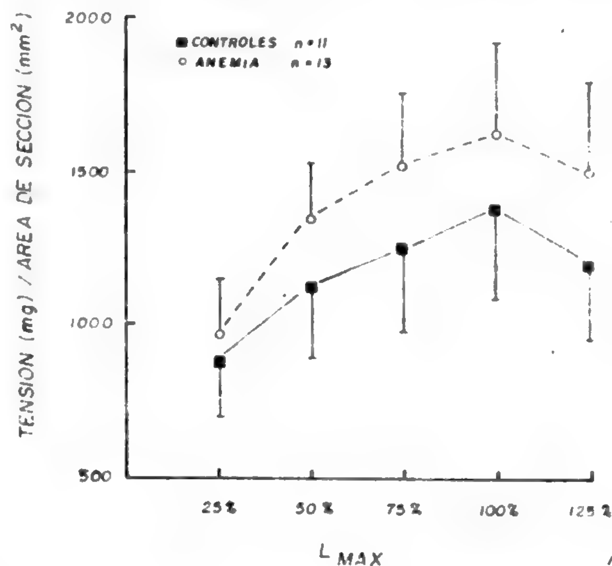


Fig. 2. — Tensión desarrollada por los músculos papilares corregida por el área de sección, versus longitud previa a la contracción, expresada como porcentaje respecto a la longitud que consiguió el máximo de tensión (L máx).

Se observan en todos los niveles de longitud inicial un aumento de la tensión desarrollada por los músculos papilares obtenidos de animales anémicos, respecto a los controles, pero esta diferencia no alcanzó significación estadística. En la Figura 3 se grafica el mismo fenómeno anterior, pero separando aquellos músculos que poseían un área de sección mayor de 1 mm², observándose esta vez diferencias significativas en todas las longitudes iniciales ($p < 0.001$).

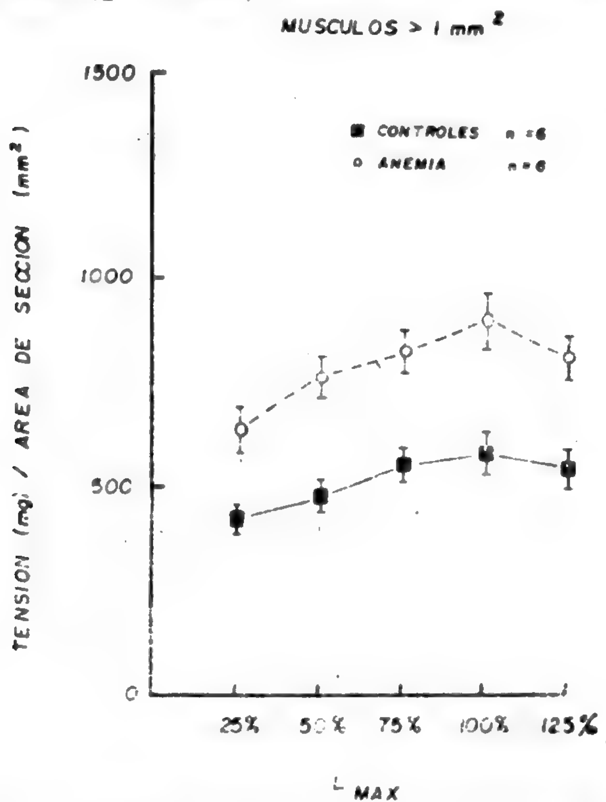


Fig. 3. — Tensión desarrollada por los músculos papilares de más de 1 mm² de área de sección, versus longitud inicial (L máx).

En la Figura 4 se grafica la velocidad de desarrollo de tensión para cada incremento de longitud inicial, observándose nuevamente en los músculos papilares totales una tendencia al incremento de la velocidad de desarrollo de tensión en la anemia, pero sin alcanzar significación estadística, en cambio en los músculos de más de 1 mm² de área de sección la diferencia es significativa. El tiempo de desarrollo máximo de tensión no fue diferente en los grupos estudiados: 200 ± 7.7 mseg para los controles y 193 ± 5 mseg para los anémicos, para el 100 % de L máx.

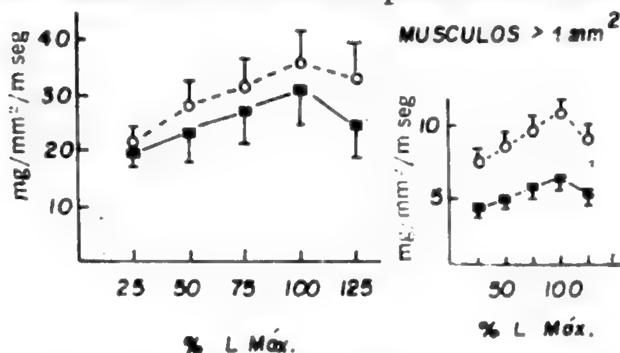


Fig. 4 .— Izquierda: velocidad de desarrollo de tensión del grupo total de músculos papilares, versus longitud inicial (L máx). Derecha: velocidad de desarrollo de tensión en los músculos mayores de 1 mm, versus longitud inicial. ■, controles n = observa el prolapso mesotelesistólico de la válvula 11; ●, anemia, n = 13.

Discusión

Hemos logrado reproducir en el gato los efectos hemodinámicos de la anemia aguda isovolémica. Observamos un aumento del gasto cardíaco a través de un aumento del volumen expulsivo, aumento de la presión diferencial y reducción de la resistencia periférica, todo lo que configura un estado circulatorio hiperdinámico.

El aumento del gasto cardíaco en la anemia aguda normovolémica inducida por recambio con dextran ha sido confirmada tanto en el animal anestesiado [5, 6], como conciente [3, 16]. La importancia relativa de los mecanismos que controlan esta respuesta son inciertos. El aumento de la frecuencia cardíaca no es constante como determinante principal del aumento del gasto; en nuestro caso la falta de respuesta cronotropa puede estar en relación con el uso de barbitúrico como agente anestésico. El volumen expulsivo aumentado puede ser explicado por una reducción importante de la resistencia periférica asociada a una disminución de la viscocidad sanguínea [5, 7, 8, 12, 14]. Recientemente se ha medido la impedancia aórtica en la anemia isovolémica, comprobándose una marcada reducción de la impedancia de entrada a frecuencia cero en la hemodilución por dextran, y una leve reducción de la impedancia característica, sugiriéndose una doble participación de vasodilatación y disminución de la viscosidad sanguínea [4].

Además de una disminución de la postcarga, se han detectado variaciones de la precarga. Escobar y col. [5] midieron los volúmenes antes y después de anemia

normovolémica en el perro anestesiado, observándose una tendencia al aumento del volumen diastólico final, aunque sin significación estadística. Rodríguez y col. [16] en una preparación análoga, pero en el animal conciente comprobaron un aumento de la presión y el volumen de fin de diástole del ventrículo izquierdo, sugiriéndose una contribución del mecanismo de Frank-Starling. Estos mismos autores encontraron un aumento en la dP/dt máxima, de la velocidad media de acortamiento circunferencial, del máximo de aceleración del flujo aórtico, y de la velocidad del elemento contráctil, lo que los llevó a postular un aumento concomitante de la contractilidad. Sin embargo, se ha discutido que estos índices sean sensibles sólo a cambios de la contractilidad, existiendo evidencias de su dependencia de variaciones de precarga y postcarga [1, 2, 17].

Nuestro objetivo se centró por lo tanto en estimar la contractilidad excluyendo la influencia de la pre y postcarga, midiendo la fuerza isométrica del músculo papilar aislado. Esta metódica ha demostrado su utilidad en condiciones agudas en la detección del factor miocardio depresor en el shock hemorrágico [10, 11]. Se observó un mayor desarrollo de tensión y una mayor velocidad para alcanzar tensión en los músculos papilares de animales anémicos, que alcanzó niveles de significación en los músculos mayores de 1 mm^2 de sección. Este efecto sería diferente de las catecolaminas, ya que no observamos la reducción del tiempo al máximo de tensión que es característica de las aminas simático miméticas [15]. Es posible que intervenga un factor humoral el que sería de interés identificar, cuyo efecto persista en el músculo papilar. Como explicación del mayor efecto en los músculos papilares más gruesos, se podrían emitir sólo hipótesis especulativas, como una mayor superficie en relación al volumen en los músculos más delgados, que permitiera una mayor velocidad de difusión hacia el perfundido de la posible sustancia humoral; o bien postular la posibilidad de una sustancia inótropa que fuera más activa en el músculo isquémico: el músculo más grueso en su porción central tiene relativamente menor oxigenación. Como mecanismo adaptivo del corazón en una situación de anemia es dable un aumento de la contractilidad del miocardio, que contribuya al aumento del gasto cardíaco. Nuestros resultados son concordantes con esta hipótesis y con datos obtenidos en estudios previos en el animal entero [8].

Resumen

Con el objeto de correlacionar los cambios hemodinámicos con los cambios del estado contráctil producidos por la anemia aguda normovolémica, se estudiaron 14 gatos (1.7 a 4 kg de peso), bajo anestesia con pentobarbital (30 mg/kg) registrándose presión de aurícula derecha, (PAD), presión arterial y gasto cardíaco (GC) con verde de indocianina. En 7 animales controles se extrajeron inmediatamente músculos papilares del VD montándose preparación para medir tensión isométrica, con tensiones de reposo variables. Se utilizó un baño de Ringer Locke a 30° C con mezcla de 95 % de O_2. En 7 gatos, después de registros basales y a tórax cerrado, se recambiaron 25 cc de sangre/kg de peso, por dextran al 6 % repitiéndose a los 20 minutos registros hemodinámicos, toma de muestras y preparación del músculo papilar. El hematocrito bajó en un 51 % ($p < 0.001$) después del recambio, la resistencia periférica en un 34 % ($p < 0.001$) y el GC subió en un 43 % ($p < 0.01$). No hubo cambios significativos en la frecuencia cardíaca, PAD, ni presión parcial de gases en sangre arterial. En cuanto a la tensión máxima desarrollada/mm^2 y a la velocidad de desarrollo de tensión de los músculos papilares, hubo aumento significativo (52 % y 74 %, respectivamente, $p < 0.001$) en los músculos mayores de 1 mm^2 de área de sección. En conclusión, nuestros datos apoyan la hipótesis de un aumento del estado contráctil del corazón en la anemia normovolémica aguda.

Summary

CARDIAC FUNCTION IN EXPERIMENTAL ACUTE NORMOVOLEMIC ANEMIA.

The increment of the cardiac output (CO) observed in acute normovolemic anemia (ANA) can be attributed to a reduction of afterload. Moreover an enhanced contractility has been postulated, which is very difficult to assess in the intact animal. The purpose of this study was to correlate the hemodynamic changes induced by ANA and variations of the myocardial contractile state. Fourteen cats were studied, their weights ranging from 1.7 to 4 kg. Pentobarbital (30 mg/kg) anesthesia was used; right atrial, systemic arterial pressures (AP) were monitored, and CO was determined by dye dilution curves (indocyanine green). In seven animals (control group) the papillary muscles of the right ventricule were removed and placed in Ringer Locke solution for isometric tension measurements. The solution was 30° C with O_2 (95 %) continuously bubbling in it. In another seven cats (anemia experimental group), after baseline readings and prior to opening the chest, 25 cc/kg of blood were exchanged by 65 % dextran. Twenty minutes later, after the readings were again taken, the papillary muscles of the right ventricule were removed and treated as described for the control group. In Table 1 are shown hematocrit and arterial blood gases values for the control and the experimental group, before and after the exchange of blood by dextran. There was a 51 % drop in hematocrit after the exchange ($p < 0.001$). In Table 2 and Figure 1 the hemodynamic values for the same groups are shown: there were no significant differences between the control group and the baseline values of the experimental group, with the exception of a lesser mean AP in the last group ($p < 0.05$). After the exchange, there was a 43 % increment in CO ($p < 0.01$), a 49 % increment in stroke volume ($p < 0.05$) and a 34 % drop in peripheral resistance ($p < 0.001$). In figure 2, the maximal developed tension normalized by the cross sectional area of the papillary muscles versus variation of the initial length are plotted (% L max). The papillary muscles from ANA animals developed more tension than controls, but the differences were significant only for muscles larger than 1 mm² of cross sectional area ($p < 0.01$) (Fig. 3). The same tendency was seen when the rate of development of tension was plotted versus % L max (Fig. 4). It is concluded that our data suggest an enhanced contractility in ANA.

Agradecimiento: Este trabajo ha sido financiado por el Servicio de Desarrollo Científico y Creación Artística de la Universidad de Chile.

Bibliografía

1. Braunwald E, Ross J, Sonnenblick EH: Mechanisms of contraction in the normal and the failing heart. Second Edition. Little Brown, Boston, 1976.
2. Brutsaert DL, Sonnenblick EH: Cardiac muscle mechanic in the evaluation of myocardial contractility and pump function: problems, concepts, and directions. *Prog Cardiovasc Dis* 16: 337, 1973.
3. Chamorro GA, Rodríguez JA, Dzindzio E et al : Effect of acute isovolemic anemia on cardiac output and estimated hepatic blood flow in the conscious dog. *Circulation Res* 32: 530, 1973.
4. Clarke TN, Prys Roberts C, Birro G et al: Aortic input impedance and left ventricular energetics in acute isovolemic anemia. *Cardiovasc Res* 12: 49, 1978.
5. Escobar E, Jones NL, Rapaport E et al: Ventricular performance in acute normovolemic anemia and effects of beta blockade. *Am J Physiol* 211: 877, 1966.
6. Fowler NO, French RH, Bloom WL: Hemodynamic effects of anemia with and without plasma volume expansion. *Circ Res* 4: 319, 1956.
7. Fowler NO, Holmes JC: Dextran exchange anemia and reduction in blood viscocity in the heart lung preparation. *Am Heart J* 68: 204, 1964.
8. Fowler NO, Holmes JC: Ventricular function in anemia. *J Appl Physiol* 31: 260, 1971.
9. Glick G, Plauth WH, Braunwald E: Role of the autonomic nervous system in the circulatory response to acutely induced anemia in unanesthetized dogs. *J Clin Invest* 43: 2112, 1964.
10. Lefer AM, Craddock GB, Cowgill R et al: Performance of papillary muscles isolated

from cats in postoligemic shock. *Am J Physiol* 211: 687, 1966.

11. Lefer AM, Martin J: Relationship of plasma peptides to the myocardial depressant factor in hemorragic shock in cats. *Circulation Res* 26: 59, 1979.
12. Murray JF, Escobar E: Circulatory effects of blood viscocity: comparison of metahemoglobinemia and anemia. *J Appl Physiol* 25: 594, 1968.
13. Murray JF, Rapaport E: Myocardial metabolism in acute normovolemic anemia. *Cardiovasc Res* 6: 360, 1972.
14. Murray JF, Escobar E, Rapaport E: Effects of blood viscosity on hemodynamic responses in acute normovolemic anemia. *Am J Physiol* 216: 638, 1969.
15. Rauter H: Localization of beta adrenergic receptors and effect of noradrenaline and cyclic nucleotides on action potentials, ionic current and tension in mammalian cardiac muscle. *J Physiol* 242: 420, 1974.
16. Rodríguez JA, Chamorro GA, Rapaport E: Effect of isovolemic anemia on ventricular performance at rest and during exercise. *J Appl Physiol* 36: 28, 1974.
17. Sonnenblick EH, Strobeck JE: Derived indexes of ventricular and myocardial function. *New Engl J Med* 296: 978, 1977.

— — — —

The more experienced the scientist is, the more clearly he realizes that there is no such thing as "the scientific method". What we can say with complete confidence is that all advances in scientific understanding begin with a guess, an imaginative preconception of what the truth might be a hypothesis, finding whether what we think might be true is true or not. If it is not, and more often than not it is not, then we have to think again... But creative imaginations, no matter how sharp, are not enough. We all need a little luck.

Cuanto más experiencia tiene el investigador, más se da cuenta que no existe el llamado "método científico". Lo que podemos decir con total confianza es que todos los adelantos en el conocimiento científico empiezan con una adivinanza, una imagen preconcebida de lo que la verdad pueda llegar a ser. Si no es tal, y lo más frecuente es que no lo sea, entonces tenemos que pensar de nuevo... Pero las imaginaciones creadoras no bastan. Todos necesitamos un poco de suerte.

Peter B. Medawar

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 153-156 (1981)

SODIO TOTAL INTERCAMBIABLE EN HIPERTENSION ESENCIAL E HIPERTENSION CON INSUFICIENCIA RENAL CRONICA

R. A. SANCHEZ, E. J. MARCO, SUSANA A. BREA, MARIA MAGDALENA BOURGES, B. H. GILBERT, L. MOLEDO

Hospital Instituto de Cardiología, Fundación H. Pombo de Rodríguez, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

El sodio ha sido implicado, tanto por estudios epidemiológicos como experimentales, en la patogenia de la hipertensión arterial (HA) [3, 5, 14]. El aumento de la ingestión de sodio podría dar por resultado un aumento de la resistencia vascular a través de un cierto número de mecanismos, incluyendo la retención de agua que conduce a un aumento del espesor de la pared vascular con respecto a la luz [29], una alteración de la naturaleza de los receptores específicos de la membrana [4], alteraciones en los flujos de iones [12] y efectos sobre la proteína contráctil [11]. La ingestión de sodio en los sujetos normotensos no altera apreciablemente la presión arterial (PA) [1]. Inversamente, una carga de sodio en sujetos con hipertensión marginal, aumenta la PA [16]. Este hallazgo proporciona una prueba directa de que en el hombre, los mecanismos compensadores previenen normalmente la inducción de la hipertensión por el sodio. El propósito del presente estudio es comparar el sodio total intercambiable ($Na_{22}i$) en pacientes hipertensos esenciales (HE) e hipertensos con severa insuficiencia renal crónica (IRC) y relacionar estos valores con los de presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM).

— — — —

Recibido: 16-VII-1980. Aceptado: 10-XII-1980

Dirección postal: Hospital Instituto de Cardiología Fundación H. Pombo de Rodríguez, Coronel Díaz 2423, 1425 Buenos Aires, Argentina.

Material y métodos

Se estudiaron 32 pacientes hipertensos ambulatorios: 19 eran HE sin alteración de la función renal y 13 presentaban HA asociada a IRC (clearance de creatinina < 60 ml/min).

La edad de los HE sin IRC era de 41 ± 4.5 años; 10 eran hombres y 9 mujeres. El peso en este grupo era de 65 ± 6 kg. La edad de los hipertensos con IRC era de 53 ± 5 años; 9 eran varones y 4 mujeres y el peso era de 61 ± 4,5 kg.

El clearance de creatinina en los HE era de 98 ± 3 ml/min, mientras que en el grupo de hipertensos con IRC fue de 46 ± 6 ml/min.

Se procedió con el total de los pacientes de la siguiente manera: se los mantuvo sin medicación y sometidos a una dieta con 100-200 mEq de cloruro de sodio diarios, durante 15 días, al cabo de los cuales se determinó el $Na_{22}i$ que fue medido con $ClNa_{22}$ en solución acuosa (The Radiochemical Centre Amersham England) administrando por vía oral de 5 a 8 μCi. Según el método clásico [19, 30], se midieron por duplicado orina homogeneizada y centrifugada de 24 horas, muestra de plasma de 24 horas, y dilución 1 en mil de la dosis en cristal de centelleo. La dosis de radiación absorbida (órgano crítico: todo el cuerpo = gónadas) por estudio fue de 0.1 rads.

El sodio plasmático fue medido en fotómetro de llama expresándose en mEq por kg de peso corporal. Las mediciones fueron realizadas a las 9 AM. En las mujeres el $Na_{22}i$ se determinó al 8º día del ciclo menstrual.

Con el fin de validar el método fueron estudia-

dos 11 sujetos normales, 7 hombres y 4 mujeres de 29 ± 4 años de edad y con un peso de 62 ± 9 kg. El $Na_{22}i$ en este grupo de normales fue de 36.7 ± 4.3 mEq/kg siendo estos valores similares a los hallados por otros autores [10, 18, 23]. La PA se registró el mismo día del estudio según el siguiente procedimiento: tres determinaciones sucesivas en posición supina y de pie con intervalos de 5 minutos entre cada toma, consignándose el promedio de las 3 tomas.

La PAM fue calculada según la siguiente fórmula: $PAM: \frac{PAS - PAD}{3} + PAD$.

Los resultados de este estudio se expresaron como medias ± 1 DS y fueron analizados estadísticamente por el test de Student para muestras no apareadas.

Resultados

En el grupo de HE el $Na_{22}i$ fue de 33.4 ± 4.15 mEq/kg y en los hipertensos con IRC fue de 38.7 ± 7.2 mg/kg ($p < 0.02$).

En el grupo de HE se obtuvo una correlación negativa al relacionar el $Na_{22}i$ con la PAD siendo: $r = -0.53$; $b = -0.94$ y $p < 0.01$ (Fig. 1). La PAD fue de 105 ± 7.4 mm Hg en promedio.

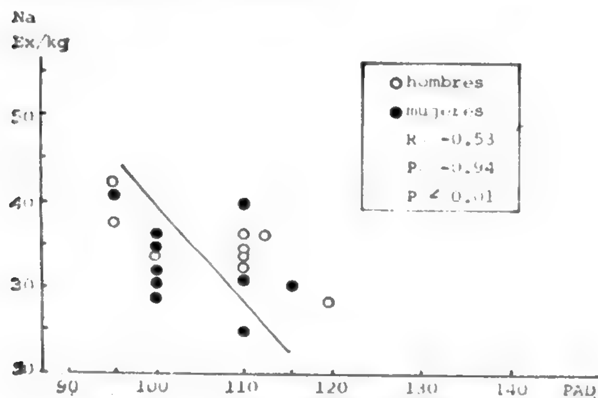


Fig. 1. — Hipertensión esencial.

Igualmente en este grupo de pacientes se obtuvo una correlación negativa al relacionar el $NA_{22}i$ con la PAM siendo: $r = -0.67$; $b = -1.5$ y $p < 0.01$ (Fig. 2).

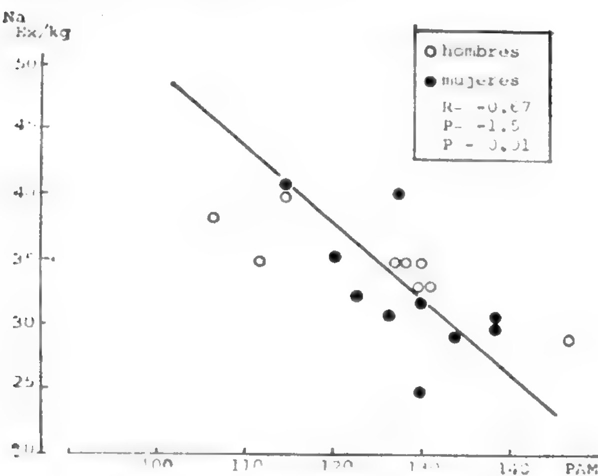


Fig. 2. — Hipertensión esencial.

El promedio de PAM fue de 126.7 ± 9.4 mm de Hg. En el grupo de hipertensos con IRC se obtuvo una correlación positiva entre $Na_{22}i$ y PAD, siendo: $r = 0.76$; $b = 1.12$ y $p < 0.01$ (Fig. 3). La PAD promedio fue de 111.53 ± 5.6 mm Hg.

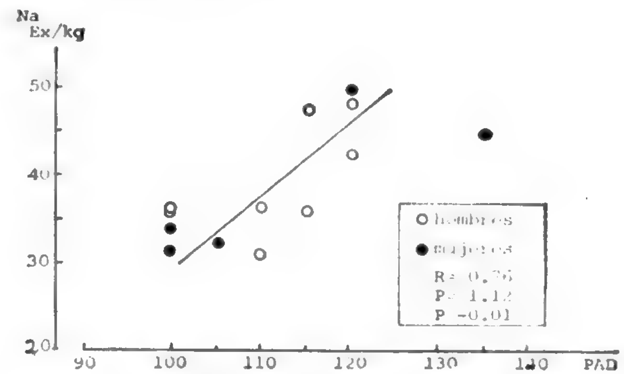


Fig. 3. — Hipertensión renal.

También la correlación obtenida fue positiva entre $Na_{22}i$ y PAM con $r = 0.51$; $b = 0.90$ y $p < 0.01$ (Fig. 4).

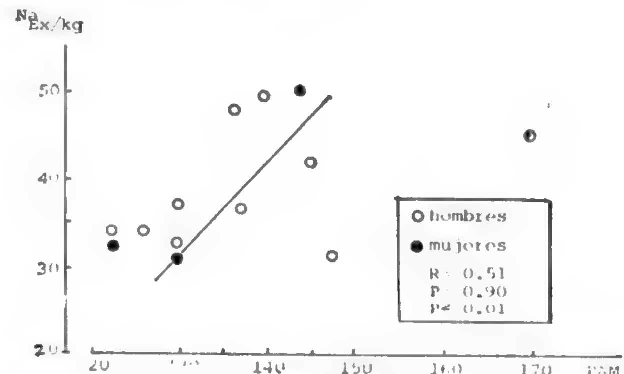


Fig. 4. — Hipertensión renal.

El promedio de PAM en este grupo fue 136.9 ± 7.6 mm Hg.

Discusión

El $Na_{22}i$ es expresión del espacio extracelular [18] y el riñón es el órgano más importante en la homeostasis del mismo [22]. La presencia de un $Na_{22}i$ elevado observada en el grupo de hipertensos con IRC pone de manifiesto la incapacidad del riñón insuficiente para mantener esta regulación [15]. De esta manera los niveles de $Na_{22}i$ significativamente más elevados encontrados en los pacientes hipertensos con IRC que en los HE son expresión del aumento habitual del fluido extracelular en los nefrópatas con grados significativos de IRC pero previos a los niveles severos que caracterizan a los enfermos en diálisis.

La correlación positiva hallada entre $Na_{22}i$ y PAD en pacientes hipertensos con IRC, similar a la comprobada entre volemia y PA en este tipo de pacientes, refleja un estado en el que el fracaso del riñón en la regulación del sodio se acompaña de un aumento concomitante de la PA [6, 7, 9, 24, 31]. Por lo tanto, en los pacientes con IRC el volumen extracelular desempeña un papel activo en la severidad de la HA aunque no debería descartarse como otro factor participante el sistema renina angiotensina.

La correlación negativa hallada en el grupo de HE sin IRC merece un comentario especial. Son conocidas las reiteradas comprobaciones de una correlación inversa similar entre volemia y PA, vinculable a una alteración del coeficiente de participación VP/FI * ya que a grados más elevados de presión se produce un reajuste tal que termina en un mayor paso de fluido al intersticio [26, 28]. Nosotros no esperábamos que una correlación negativa similar se produjese entre Pa y $Na_{22}i$ porque lo que falta en un sector estaría en el otro. Además, el valor del $Na_{22}i$ en los HE fue normal. Tendríamos que aceptar entonces que el mecanismo sería el de diuresis por presión [2, 8, 17, 25]. El hecho de no hallar valores de $Na_{22}i$ reducidos en los HE se explicaría por observaciones preliminares en las cuales se ha demostrado que existe un mecanismo de diuresis por presión atenuado, o sea que el riñón excreta el sodio aunque a niveles de ajuste de PA más elevados [13, 21]. Esto podría deberse a dos mecanismos: 1) a la pérdida de sensibilidad de los mecanismos de autoregulación renal de la excreción de sodio, y 2) a la contracción del volumen que actuaría como factor limitante de la pérdida excesiva de sodio [20].

Resumen

Con el fin de evaluar la participación del sodio total intercambiable ($Na_{22}i$) en la evolución de la hipertensión arterial (HA), se estudiaron 19 hipertensos esenciales (HE) y 13 hipertensos con insuficiencia renal crónica (IRC) (clearance de creatinina < 60 ml/min). Se utilizó el sodio$_{22}$ (5μCi) como media del $Na_{22}i$. Asimismo se estudió una población de 11 normotensos con el fin de validar el método, siendo el valor promedio del $Na_{22}i$ de 36.7 ± 4.3 mEq/kg. Los hipertensos con IRC presentaron un $Na_{22}i$ mayor (38.7 ± 7.2 mEq/kg) que los HE (33.4 ± 4.15 mEq/kg), ($p < 0.02$). Se obtuvo una correlación negativa entre Presión Arterial Media y $Na_{22}i$ en HE ($r = -0.67$), mientras que en los hipertensos con IRC la correlación fue positiva ($r = 0.51$). Se concluye que el Na_{22} participa en la evolución de la HA en aquellos pacientes con IRC. La correlación negativa observada en la HE sería expresión del mecanismo de diuresis por presión aunque ajustado a un nivel mayor de presión arterial con el fin de evitar la depleción salina.

Summary

EXCHANGEABLE SODIUM IN ESSENTIAL AND IN RENAL INSUFFICIENCY HYPERTENSION.

In order to evaluate the role of exchangeable sodium (ENa_{22}) in hypertension, 19 essential hypertensive patients and 13 hypertensive subjects with chronic renal failure (clearance of creatinine less than 60 ml/min), were studied. By the ENA_{22} method the average value for 11 normotensive subjects was found to be 36.7 ± 4.3 mEq/kg. We found that the ENa_{22} was higher in hypertensive subjects with chronic renal failure (38.7 ± 7.2 mEq/kg) than in those with essential hypertension (33.4 ± 4.15 mEq/kg) ($p < 0.02$) Furthermore, in essential hypertension we observed that a negative correlation exists between mean blood pressure (MBP) and ENa_{22} ($r = -0.67$) with a positive correlation for those with chronic renal failure ($r = 0.51$). It was concluded that body fluid volume plays an important role in the maintenance of hypertension in patients with severe chronic renal failure. The negative correlation between MBP and ENa_{22} observed in the patients with essential hypertension suggests that a mechanism of pressure natriuresis may be involved. However, this

---

* VP = volumen plamástico; FI = fluido intersticial.

mechanism would become adjusted to the higher levels of blood pressure in order to prevent sodium depletion.

Bibliografía

1. Abboud FM: Effects of sodium, angiotensin and steroids on vascular reactivity in man. *Fed Proc* 33: 143, 1974.
2. Brenner BM, Berliner RN: Relationship between extracellular volume and fluid reabsorption by the rat nephron. *Am J Physiol* 217: 6, 1969.
3. Brown WJ (Jr), Brown FK, Krishan I: Exchangeable sodium blood volume in normotensive and hypertensive humans on high and low sodium intake. *Circulation* 43: 508, 1971.
4. Brunner HR, Chang P, Wallach R, Sealey SE, Laragh JH: Angiotensin II vascular receptors: their avidity in relationship to sodium balance, the autonomic nervous system and hypertension. *J Clin Invest* 51: 58, 1972.
5. Corcoran AC, Taylor RO, Page IH: Controlled observations on the effects of low sodium dietotherapy in essential hypertension. *Circulation* 3: 1, 1951.
6. Dathan JRE, Goodwing FG: The relationship between body fluid compartment volumes, renin and blood pressure in chronic renal failure. *Clin Sci* 42: 2, 1972.
7. De Planque PA, Mulder E, Mees JD: The behavior of blood and extracellular volume in hypertensive patients with renal insufficiency. *Acta Med Scand* 186: 75, 1969.
8. Dirks JH, Cirksena WJ, Berliner RW: The effect of saline infusion on sodium reabsorption by the proximal tubule of the dog. *J Clin Invest* 44: 1160, 1965.
9. Dustan HP, Page IH: Some factors in renal and renoprival hypertension. *J Lab Clin Med* 64: 948, 1964.
10. Hansen J: Blood volume and exchangeable sodium in essential hypertension. *Acta Med Scand* 184: 517, 1968.
11. Hollander WA, Shibata N: Mode of action of sodium on the contractile proteins of the arteries. *J Clin Invest* 47: 47, 1968.
12. Jones AW, Hart RG: Altered ion transport in aortic smooth muscle during deoxycorticosterone acetate hypertension in the rat. *Circ Res* 37: 333, 1975.
13. Kül F: Pressure diuresis and hypertension. *Scand J Clin Lab Invest* 35: 289, 1975.
14. Kohlstaedt KG, Moser N, Francis T: Panel discussion on genetics and environmental factors in human hypertension. *Circulation* 17: 728, 1959.
15. Langstrom JD, Guyton AC, Douglas BH: Effect of changes in salt intake on arterial pressure and renal function in partially nephrectomized dogs. *Circ Res* 12: 50, 1963.
16. Mark AL, Lawton WJ Abboud FM, Fitz AE, Connor WE, Heistad DD: Effects of high and low sodium intake on arterial pressure and forearm vascular resistance in borderline hypertension. *Circ Res* 37 (Suppl 1): 1, 1975.
17. Martínez-Maldonado M, Eknoyan G, Suki WN: Diuretics in nonedematous states, physiological basis for the clinical use. *Arch Intern Med* 131: 797, 1973.
18. Moore FD, Olesen KH, Mc Murrey JD, Panken HB, Ball MR, Boyden CM: In the body cell mass and its supporting environment body composition in health and disease. Edit Saunders, 1963.
19. Olesen KH: Body composition in heart disease, total exchangeable potasium, total exchangeable sodium, total exchangeable chloride and derived values for body composition in cardiac disease with and without edema. *Acta Med Scand* 175: 301, 1964.
20. Omvik P. Tarazi RC, Bravo EL: Regulation of sodium balance in hypertension. *Hypertension* 2 (4): 515, 1980.
21. Onesti G, Schwartz DB, Kim KE, Swartz C, Brest DN: Pharmacodynamic effects of a new antihypertensive drug. Catapres (ST-155). *Circulation* 39: 219, 1969.
22. Pits RF: Physiology of the kidney and body fluids. 3ª Edition, Year Book Medical Publisher, Chicago, 1972.
23. Ros EJ: Total exchangeable sodium in hypertension. *Clin Sci* 15: 81, 1956.
24. Schalekamp MA, Beevers DG, Briggs JD, Brown JJ, Davies DL, Frasser R, Lebel M, Lever AF, Medina A, Morton JJ, Robertson JIS, Tree M: Hypertension in chronic renal failure, and abnormal relation between sodium and the renin-angiotensin system. *Am J Med* 55: 379, 1973.
25. Schalekamp MADH, Krauss XH, Schalekamp-Kuyken MPA, Kolsters G, Birkenhager WH: Studies on the mechanism of hypernatriuresis in essential hypertension in relation to measurements of plasma renin concentration, body fluid compartments and renal function. *Clin Sci* 41: 219, 1971.
26. Tarazi RC, Dustan HP, Frohlich ED: Relation of plasma to interstitial fluid volume in essential hypertension. *Circulation* 40: 357, 1969.
27. Tarazi RC, Dustan HP, Frohlich ED, Gifford RW (Jr), Hoffman GC: Plasma volume and chronic hypertension relationship to arterial pressure levels in different hypertensive diseases. *Arch Intern Med* 125: 835, 1970.
28. Tarazi RC, Frohlich ED, Dustan HP: Plasma volume in men with hypertension. *N Engl J Med* 278: 762, 1968.
29. Tobian L (Jr), Binion JT: Tissue cations and water in arterial hypertension. *Circulation* 5: 754, 1952.
30. Veall N, Vetter H: Técnicas con radioisótopos para la investigación y el diagnóstico en clínica. Cap XI, Editorial EUDEBA, 1964.
31. Wilkinson R, Scott DF, Uldall PR, Ken DNS, Swinney J: Plasma renin and exchangeable sodium in the hypertension of chronic renal failure. The effect of bilateral nephrectomy. *Quart J Med* 39: 377, 1970.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 157-166 (1981)

SELECTIVIDAD TISULAR E INDICADORES DE VIRULENCIA DE TRES CEPAS DEL VIRUS JUNIN

MARIA M. AVILA *, **R. M. LAGUENS** **, **R. P. LAGUENS**, **MERCEDES C. WEISSENBACHER** ***

Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, y Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Poco tiempo después del aislamiento del virus Junin, agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina, se demostró que el cobayo es uno de los animales de laboratorio más sensibles a este virus [3], induciendo un 100 % de mortalidad entre los 11 y 14 días después de la infección experimental con cepas patógenas. En 1968, el hallazgo de cepas virales que no matan a estos animales llevó a su uso como marcador de virulencia [8]. En el año 1976, se corroboraron estos hallazgos que indicaban que el cobayo inoculado por vía intramuscular es un excelente sistema in vivo para la diferenciación de cepas [6]. La mayor o menor patogenicidad de las distintas cepas de este virus para el humano parece correlacionarse con la morbimortalidad que las mismas producen en el cobayo. En trabajos anteriores se demostró que la diseminación viral en órganos del cobayo inoculado con la cepa atenuada $XJCl_3$ está restringida sólo a algunos órganos [1], mientras que la diseminación de la cepa patógena XJ está mucho más generalizada y alcanza títulos más altos [9]. Basándonos en estos antecedentes, pensamos comprobar si otros parámetros tales como la mayor o menor velocidad de la diseminación viral en los diferentes órganos, la viremia, la cronología de aparición de anticuerpos humorales, así como la concentración viral en los diferentes órganos del cobayo, el daño histológico en distintos tejidos y la presencia de antígeno viral detectado por inmunofluorescencia (indicadores, preferentemente estos tres últimos, de una selectividad tisular), podrían ser utilizados como marcadores de atenuación más precisos y objetivos para las distintas cepas del virus Junin. A pesar de los extensos estudios sobre fisiopatología de la infección con virus Junin, aún no se conocen exactamente el o los factores que determinan la prevalencia de una u otra forma clínica. Mediante la inoculación al cobayo de cepas de virus Junin de diferente virulencia, en este trabajo también se han intentado esclarecer los mecanismos patogénicos que enferman y/o matan al cobayo, partiendo de la base de que un mismo huésped puede reaccionar de distinta manera a diferentes cepas virales, por lo que hemos utilizado en este experimento la cepa

Recibido: 17-XII-1980. Aceptado: 11-III-1981.

* Becaria del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Becario de SECYT (Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología).

*** Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET.

Dirección postal: Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Paraguay 2151, piso 11, 1121 Buenos Aires, Argentina.

MC_2, que presenta una mortalidad intermedia entre la cepa patógena prototipo XJ y la atenuada $XJCl_3$ [2].

Material y métodos

Virus

Cepa $XJCl_3$: con cuatro pasajes en ratón albino lactante después del antígeno utilizado para vacunar a los 636 voluntarios [11]. El título fue de $10^{7,9}$ $DICT_{50}$/ml, utilizando células Vero.

Cepa MC_2: con cuatro pasajes en cerebro de ratón albino lactante (cedido gentilmente por la Dra. Martínez Segovia, del Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán") con un título de $10^{6,2}$ $DICT_{50}$/ml. La cepa MC_2 fue aislada de vísceras de un roedor silvestre del género *Calomys*, capturado en una zona del área endémica de la Provincia de Buenos Aires.

Cepa XJ prototipo patógena: con un título de $10^{7,0}$ $DICT_{50}$/ml.

Los stocks de virus fueron preparados como un homogeneizado al 10 % de cerebro de ratón albino lactante infectado, en solución de Hanks con 10 % de suero de ternera inactivado.

Animales

Cobayos: se utilizaron animales machos de exocría de 350 a 450 g de peso.

Ratones: cepa Rockland, de 24-48 h de vida, fueron inoculados por vía intracerebral con un volumen de 0.02 ml.

Células

Vero: línea continua de células de riñón de mono *Cercopithecus*. Se utilizaron cultivos confluentes en el pasaje 210-240, sembradas en tubos 48-72 h antes de ser usadas. El medio de crecimiento fue HLS (solución de Hanks conteniendo 0.5 % de hidrolizado de lactoalbúmina y 6 % de suero de ternera inactivado) y el medio de mantenimiento fue Eagle L.

Esquema de infección

Se inocularon 50 cobayos por vía intramuscular en la pata posterior izquierda con 1000-5000 $DICT_{50}$ de cada una de las cepas usadas, en un volumen de 0.2 ml. Diez cobayos considerados controles normales fueron inoculados con un homogeneizado de cerebro de ratón normal utilizando la misma dilución que los stocks de virus. Todos los cobayos se controlaron diariamente desde el punto de vista clínico, registrándose su peso y mortalidad durante seis meses.

Toma y procesamiento de las muestras

Los cobayos fueron sacrificados por exanguinación por punción intracardíaca a los 3, 6, 9, 12, 15, 17, 20, 23, 27, 34, 43, 65, 85 y 184 días post infección (pi), para los inoculados con la cepa $XJCl_3$; a los 7, 12 y 21 días pi para los inoculados con la cepa MC_2; y a los 3, 6, 9 y 12 días pi para los que recibieron la cepa patógena XJ prototipo. Se sacrificaron 5 animales inoculados y un control para cada una de las cepas. Los inoculados con la cepa MC_2 fueron sangrados a los 5, 7, 12, 15, 21, 35 y 68 días pi. El suero se fraccionó y se guardó a —70° C. Inmediatamente después de la muerte de los cobayos se practicó una autopsia, realizándose en todos los casos una observación macroscópica detallada.

Se tomaron en forma estéril muestras de los siguientes órganos: riñón, pulmón, timo, bazo, glándula salival, adrenal, encéfalo, hígado, médula ósea y ganglios linfáticos. Con las mismas se realizaron los siguientes estudios:

Aislamiento y titulación viral:

Los órganos de los cobayos sacrificados a los 7, 12 y 21 días pi se homogeneizaron al 10 % en solución de Hanks con 10 % de suero de ternera inactivado. La suspensión resultante se centrifugó a 9000 g durante 60 minutos en frío y el sobrenadante se fraccionó y conservó a —70° C. Para la titulación del virus se realizaron diluciones decimales seriadas de los homogeneizados de órganos que fueron inoculados por vía intracerebral a ratones recién nacidos o a monocapas de células Vero. Los títulos obtenidos fueron calculados por el método de Reed y Muench [10].

Estudio anátomo-patológico

Se realizó con técnicas de microscopía de luz, para lo cual los órganos fueron fijados en solución de Bouin, incluidos en parafina y coloreados con hematoxilina-eosina (HE).

Estudio inmuno-histoquímico

De los mismos órganos mantenidos a —70° C fueron obtenidos cortes de crióstato de 2.5 μ de espesor que se trataron con suero anti-virus Junin obtenido de un paciente convalesciente de fiebre hemorrágica argentina, con un índice neutralizante de 6.0 log y post tratados con suero de cabra anti inmunoglobulinas totales humanas marcadas con fluoresceína de origen comercial (Cappell Lab. Crochranville, Pa). Los controles se realizaron preincubando cortes con suero humano de dador de sangre o bloqueando la reacción con suero de cobayo anti-virus Junin previamente a la aplicación del suero inmune humano.

Neutralización

Con el suero de los cobayos se realizaron reacciones de neutralización en tubos con monocapas de células Vero utilizando la técnica de suero constante-virus diluido, ya descriptas anteriormente [14].

Resultados

Morbimortalidad

En los animales inoculados con la cepa XJ se observó un descenso del peso corporal a partir de los 8 días pi, para morir en su totalidad antes del día 14 pi. En cambio en los animales inoculados con las cepas MC_2 y $XJCl_3$, el descenso del peso comenzó después de la segunda semana de infección y los sobrevivientes se recuperaron recién a la cuarta semana. El período de descenso del peso coincidió con el período de mayor mortalidad.

Con respecto a la mortalidad acumulativa para cada una de las tres cepas, la XJ alcanzó un 100 % de mortalidad, esto entre los 11 y los 14 días pi, con un promedio del día de muerte de 12. Con la cepa MC_2 la mortalidad fue del 76 % entre los días 14 y 26, con un promedio del día de muerte de 21. Con la cepa $XJCl_3$ la mortalidad alcanzó a 16 %, con la mayor frecuencia entre los días 19 y 27, pero se registraron muertes esporádicas hasta los 40 días pi, con un promedio del día de muerte de 25 (Fig. 1).

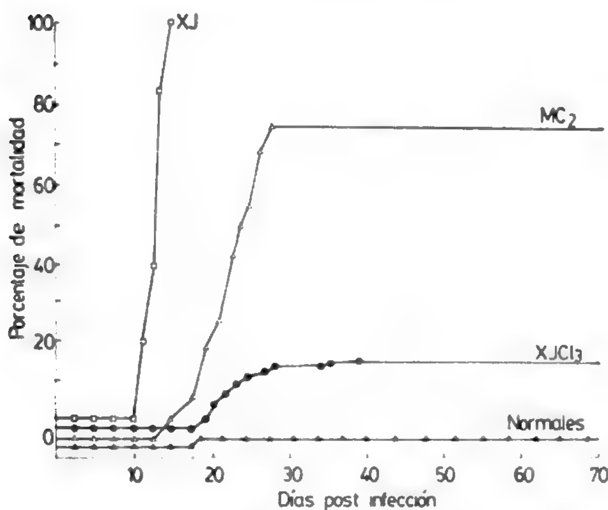


Fig. 1. — Mortalidad acumulativa en cobayos infectados con 1000-5000 $DICT_{50}$ de virus Junin, cepas XJ, MC_2 y $XJCl_3$: □ - □, cobayos inoculados con la cepa XJ prototipo; Δ - Δ, cobayos inoculados con la cepa MC_2; ● - ●, cobayos inoculados con la cepa $XJCl_3$; ▲ - ▲, cobayos normales.

Diseminación viral a los órganos

Con la cepa XJ los cobayos presentaron aislamiento positivo a los 7 y 12 días

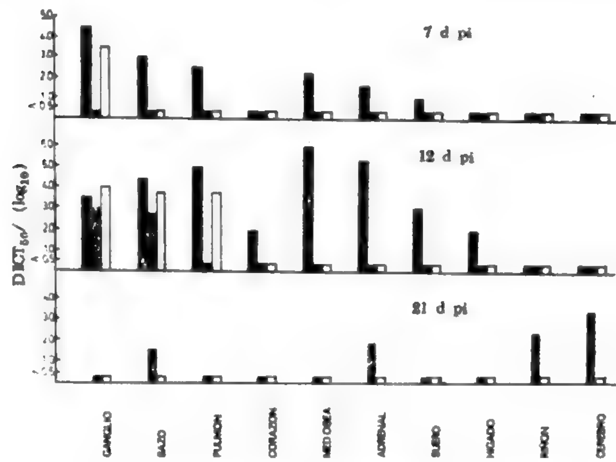


Fig. 2. — Diseminación viral en órganos y sangre de cobayos infectados con 1000-5000 $DICT_{50}$ de virus Junin, cepas XJ, MC_2 y $XJCl_3$: ■, cobayos inoc. con XJ; ▯, cobayos inoc. con MC_2; □, cobayos inoc. con $XJCl_3$.

en ganglios, bazo, pulmón, corazón, adrenal, médula ósea, hígado y suero. En los cobayos inoculados con $XJCl_3$ sólo se detectó a los 7 días, virus en ganglios y a los 12 días se diseminó a bazo, ganglio y pulmón. Los cobayos inoculados con la cepa MC_2 no presentaron virus en órganos a los 7 días pi y a los 12 días se aisló virus sólo de bazo y ganglio linfático, con un título que fue menor que el alcanzado por las otras dos cepas.

A los 21 días pi, cuando sólo sobrevivían los cobayos inoculados con MC_2 y $XJCl_3$, se aisló virus en bazo, adrenal, riñón y cerebro en los animales inoculados con MC_2; no se aisló virus de los órganos de los cobayos inoculados con $XJCl_3$ (Fig. 2).

La viremia fue alta en los animales inoculados con XJ desde el día 5 pi hasta la muerte del animal. Por el contrario, con las otras dos cepas no pudo detectarse viremia (Fig. 3).

Búsqueda de anticuerpos

En cobayos inoculados con la cepa $XJCl_3$, se comenzaron a observar niveles significativos de anticuerpos neutralizantes a los 13 días pi en algunos animales, siendo posible detectar anticuerpos en todos los animales a partir de la tercera semana post infección. El índice neutralizante fue en este momento mayor de 4 log.

En los animales inoculados con MC_2,

los anticuerpos se detectaron a los 21 días pi, llegando a títulos superiores a 2 log a los 35 días pi y alcanzando índices de neutralización mayores de 5 log a los 65 días pi.

En cambio, con la cepa XJ no se pudieron detectar anticuerpos neutralizantes, probablemente por muerte del animal antes de poder sintetizarlos (Fig. 3).

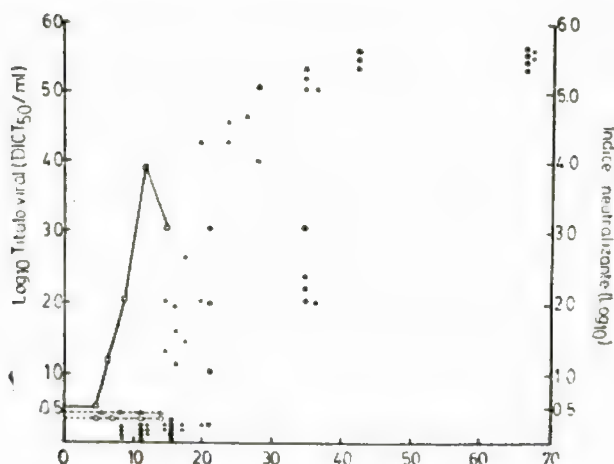


Fig. **3.** — Viremia y anticuerpos neutralizantes en el suero de cobayos infectados con 1000-5000 $DICT_{50}$ de virus Junin, cepas XJ, MC_2 y $XJCl_3$, hasta los 70 días pi: □ ——— □, viremia en cobayos inoc. con XJ; O - - - O, viremia en cobayos inoc. con MC_2; Δ - - - Δ, viremia en cobayos inoc. con $XJCl_3$; ●, anticuerpos neutralizantes en cobayos inoc. con MC_2 ▲, anticuerpos neutralizantes en cobayos inoc. con $XJCl_3$.

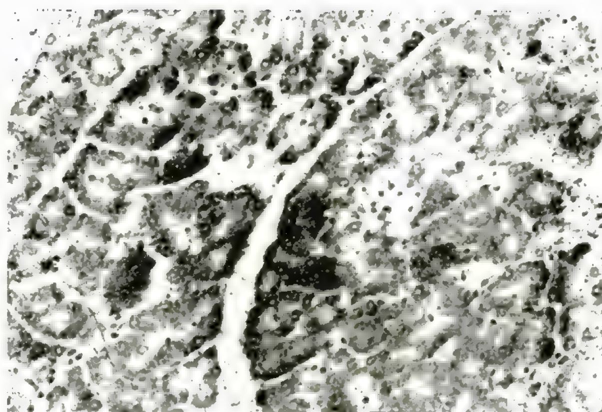


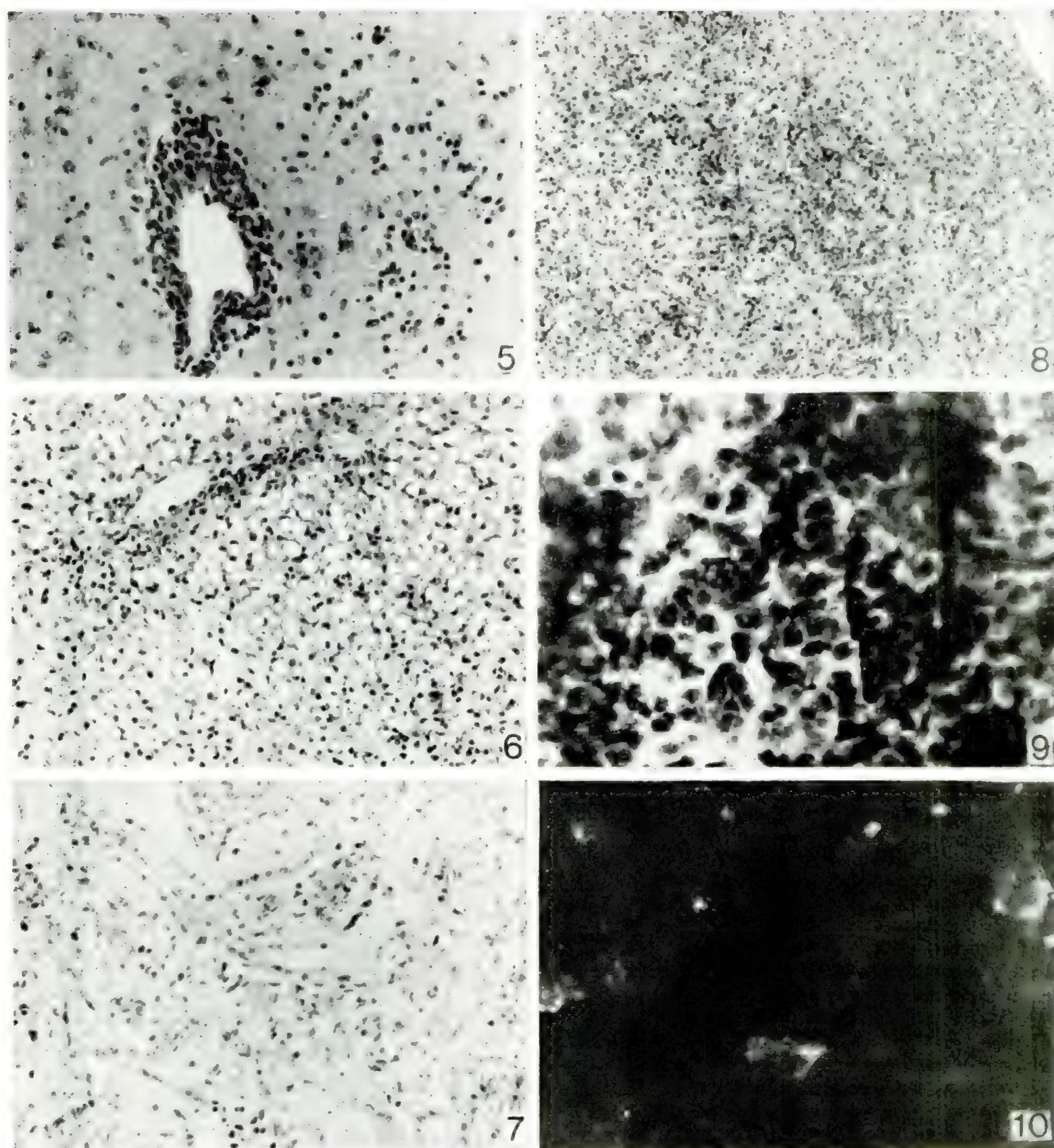
Fig. **4.** — Infiltrado linfocitario interacinar en páncreas de cobayo infectado con la cepa $XJCl_3$ (HE x 450).

Estudio morfológico

Los animales inoculados con la cepa $XJCl_3$ presentaron lesiones a nivel de páncreas, pulmón y encéfalo. El páncreas presentó un exudado inflamatorio linfomonocitario que se pudo observar desde los primeros días después de la infección y se mantuvo incluso en animales sacrificados a los 90 días pi. Este tipo de infiltrado fue de diferente magnitud, pudiéndose observar desde escasos linfocitos inter e intraacinares (Fig. 4) hasta grandes exudados que destruían la arquitectura normal del órgano. Los islotes de Langerhans mostraron infiltrados linfocitarios y picnosis de sus células en días más alejados de la infección. A los 43 días pi se observaron signos de regeneración de los islotes, consistentes en un aumento del número de células en mitosis. El pulmón mostró lesiones inconstantes hasta los 15 días pi consistentes en un discreto engrosamiento de la barrera aire-sangre por hiperplasia de los neumocitos, infiltrado constituido por células mononucleares y disminución del espacio aéreo. Las lesiones encefálicas fueron las más llamativas y consistieron en un exudado inflamatorio linfomonocitario perivascular (Fig. 5) acompañado de cuadros histológicos de meningitis. Es de destacar que las lesiones encefalíticas se observaron en los animales en peor estado clínico, como así también en los muertos espontáneamente.

La cepa MC_2 produjo lesiones de tipo inflamatorio crónico o degenerativo en encéfalo, páncreas, pulmón e hígado. El encéfalo presentó un exudado extenso, linfocitario, con movilización glial y cuadros histológicos de meningitis. Este tipo de lesión se observó en 3 de 5 animales sacrificados alrededor del día 21 pi y en todos los muertos en forma espontánea. El páncreas mostró lesiones similares a las producidas con la cepa $XJCl_3$, aunque la infiltración linfocítica de los islotes fue total en los animales que la presentaban y nunca coexistieron cuadros de daño del sector exócrino con daño insular. El hígado mostró desde los 7 días pi cambios degenerativos en los hepatocitos consistentes en vacuolización intracitoplasmática, constituyendo el cuadro de las metamorfosis grasas del hígado (Fig. 6). Estos cambios se presentaron sólo en la mitad de los animales examinados.

Con la cepa XJ se pudieron observar lesiones pulmonares, en tejido linfático, hígado y médula ósea, en la totalidad de los animales examinados. A partir de los



Figs. **5-10.** — **5**, Exudado inflamatorio linfocitario perivascular en cerebro de cobayos inoculados con $XJCl_3$ (HE x 450); **6**, Metamorfosis grasa hepática producida por la inoculación de la cepa MC_2 del virus Junin (HE x 250); **7**, Necrosis intensa de la médula ósea en cobayos inoculados con la cepa XJ patógena del virus Junin (HE x 250); **8**, Necrosis paracortical en ganglio linfático de cobayos infectados con la cepa XJ del virus Junin (HE x 150); **9**, Intensa fluorescencia positiva en tejidos linfáticos del cobayo inoculado con la cepa XJ (x 250); **10**, Antígeno del virus Junin detectado en neuronas encefálicas de cobayos inoculados con la cepa $XJCl_3$ (x 450).

7 días pi se observaron grandes áreas de condensación y hemorragia en los pulmones con intensos exudados inflamatorios que disminuían considerablemente el espacio aéreo. También en este momento se observó necrosis importante de la médula ósea y tejido linfático (Figs. 7 y 8) y degeneración celular hepatocítica con vacuolización intracitoplasmática.

Detección de antígeno viral por técnicas de inmunofluorescencia

Por medio de estas técnicas se pudo detectar la presencia de antígeno viral en

TABLA 1. — *Detección de antígeno viral por inmunofluorescencia en cobayos infectados con 1000-5000 $DICT_{50}$ de tres cepas de distinta virulencia del virus Junin (XJ, MC_2 y $BJCl_3$)*

		Días post-infección					
		7	14	21	28	35	45
	XJ	—	—				
Encéfalo	MC_2	+	—	+			
	$XJCl_3$	—	—	—	—	+	+
	XJ	+	+				
Páncreas	MC_2	+	+	+			
	$XJCl_3$	+	+	+	+	+	+
	XJ	+	+				
Bazo	MC_2	+	+	+			
	$XJCl_3$	+	+	+	+	+	+
	XJ	+	+				
Ganglios	MC_2	+	+	+			
	$XJCl_3$	+	+	+	+	+	+
	XJ	+	+				
Pulmón	MC_2	+	—	—			
	$XJCl_3$	—	+	+	—	—	+
	XJ	+	+				
Riñón	MC_2	—	—	—			
	$XJCl_3$	—	—	—	+	+	—
	XJ	+	+				
Adrenal	MC_2	+	+	+			
	$XJCl_3$	—	—	+	+	+	—
	XJ	+	+				
Hígado	MC_2	—	—	—			
	$XJCl_3$	—	—	—	—	—	—
	XJ	+	+				
Médula ósea	MC_2	—	—	—			
	$XJCl_3$	—	—	—	—	—	—
	XJ	—	—				
Corazón	MC_2	—	—	—			
	$XJCl_3$	—	—	—	—	—	—
	XJ	—	—				
Glándula salival	MC_2	—	—	—			
	$XJCl_3$	—	—	—	—	—	—

diferentes órganos del cobayo inoculado con las 3 cepas del virus (Tabla 1). En los infectados con la cepa XJ se observó antígeno a nivel de páncreas exócrino, tejido linfático (Fig. 9), pulmón, riñón, adrenal y médula ósea hasta el momento de la muerte del animal.

Con la cepa MC_2 pudo ser demostrada escasa cantidad de antígeno a nivel de los acinos pancreáticos, corteza adrenal y células reticulares del tejido linfático en todos los días de sacrificio. En el pulmón sólo se detectaron muy escasa cantidad de macrófagos alveolares antigénicamente positivos en el primer día de sacrificio. A nivel encefálico pudo ser detectada en algunos animales la presencia de antígeno viral en gran número de neuronas y en escasos vasos sanguíneos.

Con la cepa $XJCl_3$ fue observado antígeno fluorescente en páncreas tanto en su sector exócrino como endócrino, tejido linfático, pulmón y adrenal ya en los primeros momentos de la infección. Se observó además en días alejados, la persistencia de la fluorescencia en páncreas y adrenal, así como también la aparición de antígeno en el encéfalo, en el citoplasma de neuronas y sobre vasos sanguíneos, a partir de los 35 días pi (Fig. 10).

Discusión

Nuestros estudios de la infección del cobayo con tres cepas diferentes de virus Junin muestran que la acción patógena y el tropismo tisular es diferente para cada una de ellas. Si bien ya es conocido que la cepa prototipo XJ patógena produce un 100 % de mortalidad en el cobayo [3], en tanto que las dos cepas restantes muestran diferente grado de mortalidad [1, 2] los mecanismos íntimos responsables de este hecho son poco conocidos. Aparentemente, los principales órganos blanco para la replicación del virus XJ patógeno son el tejido linfático y la médula ósea, siendo la replicación viral muy intensa, ya que es posible observar elevadas viremias y recuperar altos títulos virales de los órganos. El mecanismo de daño celular con esta cepa pareciera ser directo [4], aunque como ocurre con el ratón lactante no han podido ser descartados mecanismos inmunopatológicos [7, 12].

La cepa MC_2, cuya infección produce en el cobayo una mortalidad intermedia entre las cepas prototipo XJ y la $XJCl_3$, mostró un acentuado neurotropismo ya que fue la única con la cual pudieron aislarse altos títulos de virus del encéfalo, coincidentemente con una meningoencefalitis. Con las evidencias obtenidas en el presente trabajo no es posible establecer el mecanismo de producción de las alteraciones, pues si bien se demostró antígeno viral en el citoplasma neuronal, con una acción citopática directa, lo tardío de la aparición de las lesiones, cuando ya el animal ha comenzado su respuesta inmune, plantea también la posibilidad de la existencia de mecanismos inmunopatológicos en la producción de las lesiones. La cepa $XJCl_3$, que produce baja mortalidad, mostró lesiones preferentemente en el sistema nervioso central. A diferencia de lo observado con la cepa MC_2, el aislamiento de virus del encéfalo fue excepcional y de bajo título. Por otra parte, la distribución de determinantes antigénicos virales demostrables por métodos de inmunohistoquímica fue diferente que con la cepa MC_2, ya que fue menor el número de neuronas afectadas y, además, aparecieron determinantes antigénicos en la pared de los vasos sanguíneos. De la misma manera, las lesiones morfológicas fueron diferentes: en tanto que con la cepa $XJCl_3$ las alteraciones consistieron preferentemente en perivasculitis y meningitis, con la cepa MC_2 a estas lesiones se les agregaba una encefalitis difusa. Estos hechos aparecen como altamente sugestivos de daño inmunológico.

Además de las marcadas diferencias dadas por las lesiones encefálicas y de los tejidos linfático y hemocitopoyético entre las cepas patógena y las dos atenuadas, fue posible establecer diferencias acentuadas a nivel de pulmón, hígado y páncreas. La cepa XJ produjo en forma constante una neumopatía intersticial difusa; con las otras dos cepas la lesión pulmonar fue de menor intensidad e inconstante. Lo contrario ocurrió en el páncreas en el que las dos cepas atenuadas produjeron una lesión casi constante, en tanto que no fue posible detectar lesiones con la cepa XJ. Las lesiones hepáticas fueron constantes en los animales inoculados con las cepas XJ y MC_2 y estaban ausentes en los infectados con la cepa $XJCl_3$. Los tejidos linfático y hemocitopoyético mostraron marcadas diferencias con las tres cepas. En tanto que la cepa XJ produjo destrucción masiva de estos órganos, en los animales inoculados con MC_2 o $XJCl_3$ la médula ósea mostró lesiones mínimas y el tejido linfático no solamente no mostró destrucción sino que presentó signos histológicos de hiperplasia. Además, el número de células conteniendo antígeno viral fue mucho menor que en los inoculados con la cepa XJ.

Estos resultados sugieren que el comportamiento de las diferentes cepas del virus Junin en la infección experimental del cobayo podría ser debido al tropismo hacia los diferentes órganos y a la capacidad de replicación in vivo. La cepa XJ, que replica eficientemente, produciría una mortalidad precoz por la destrucción masiva de los tejidos linfático y hemocitopoyético asociada a una neumopatía. Con las dos cepas atenuadas la replicación viral es mucho menos intensa, es más tardía, y no aparecen niveles de viremia detectables. En estos casos, en que el tiempo de sobrevida es mayor, los animales son capaces de responder inmunológicamente, hecho facilitado además por la ausencia

de destrucción del tejido linfático. Esto permitiría, por una parte la replicación del virus en órganos de difícil acceso como es el encéfalo y, también, la aparición de mecanismos inmunológicos productores de las alteraciones.

De los estudios virológicos, inmunohistoquímicos e histológicos realizados se desprende que las dos cepas atenuadas estudiadas presentan diferencias con respecto a la cepa prototipo patógena, las cuales podrían ser consideradas como indicadores de atenuación (Tabla 2). La

TABLA 2. — *Diferencias en la mortalidad, inducción de anticuerpos y localización de virus, antígeno y lesiones en cobayos infectados con tres cepas de distinta virulencia del virus Junin* *

	$XJCl_3$	MC_2	XJ
Mortalidad	16 %	76 %	100 %
Día promedio de muerte	25	21	12
Viremia	No	No	Si
Anticuerpos	Si	Si	No
Médula ósea:			
Virus	—	—	+
Antígeno	—	—	+
Lesión	—	—	++++
Tejido linfático:			
Virus	++	++	+++
Antígeno	++	—+	++
Lesión	—	—	++++
S. N. C.:			
Virus	+	++++	—
Antígeno	+	++	—
Lesión	++	++++	—

* Los cobayos se inocularon im con 1000-5000 $DICT_{50}$ de las cepas XJ, MC_2 y $XJCl_3$.

mortalidad es menor y el día promedio de muerte es mayor, no hay viremia detectable y la diseminación viral a los distintos órganos es, en general, más restringida, siendo los títulos menores. La presencia de antígeno viral detectado por inmunofluorescencia es limitada y las lesiones histológicas observadas son menos extensas y están presentes en órganos en los que nunca fue observado daño en cobayos inoculados con la cepa patógena XJ, hecho que junto con la replicación viral marca el diferente tropismo tisular de estas tres cepas del virus Junin.

Resumen

Con el fin de esclarecer los mecanismos patogénicos que enferman y/o matan al cobayo y determinar parámetros que puedan utilizarse como marcadores entre cepas atenuadas y patógenas del virus Junin, se inocularon cobayos con tres cepas de distinta virulencia de este virus (XJ, MC_2 y $XJCl_3$) y se realizaron estudios secuenciales desde el punto de vista virológico, clínico, histológico e inmunohistoquímico. La mortalidad fue del 100 % para la cepa XJ, 76 % para MC_2 y 16 % para $XJCl_3$. En los cobayos inoculados con XJ, la diseminación y replicación viral fue más rápida y generalizada, sin presentar virus en SNC. La viremia fue alta y no presentaron anticuerpos. Se observaron lesiones en hígado, tejido linfático, pulmón y médula ósea y antígeno de virus Junin en riñón, tejido linfático, médula ósea, hígado y pulmón. En los cobayos inoculados con MC_2, la diseminación viral fue más lenta y con títulos más bajos que en los inoculados con $XJCl_3$. Las dos cepas atenuadas presentaron virus en SNC y en ambas coincidió con la presencia de lesiones y anticuerpos neutralizantes, siendo las lesiones más intensas y la replicación viral notablemente más alta con la cepa MC_2. No fue posible detectar viremia con ninguna de las dos cepas atenuadas. Los otros órganos que presentaron lesiones fueron páncreas, glándula salival, SNC y pulmón. Por inmunofluorescencia se detectó antígeno en páncreas, órganos linfáticos, pulmón y cerebro. Todos estos datos nos hacen pensar en una diferente fisiopatología de la enfermedad y muerte de los cobayos, así como en una selectividad tisular que varía según la cepa de virus inoculada. Desde el punto de vista de los marcadores que podrían utilizarse para diferenciar estas cepas además de la mortalidad, y teniendo como base los resultados expuestos se deberán considerar: las diferencias en el día promedio de muerte, la ausencia de viremia y presencia de anticuerpos sólo con las cepas atenuadas y la presencia de lesiones acentuadas en tejido linfohemopoyético exclusivamente con la cepa patógena. Se debe considerar, además, la ausencia de lesión, virus y an-

tígeno en SNC con la cepa patógena XJ a diferencia de las atenuadas utilizadas en este experimento.

Summary

TISSUE SELECTIVITY AND VIRULENCE OF THREE STRAINS OF JUNIN VIRUS.

The present work was carried out to study the pathogenic mechanisms involved in the disease or death produced in guinea pigs when different strains of Junin virus were inoculated. Viremia, immune response, level of infectious virus in different organs, histological lesions and presence of viral antigen in different tissues were studied. Furthermore, results were compared in order to establish if any of these parameters could be used to differentiate virulent from attenuated strains of the virus. For such purpose guinea pigs weighing 350-450 g were inoculated with 1000-5000 $TCID_{50}$ of the pathogenic XJ prototype strain, with the MC_2 strain, of intermediate virulence and with the attenuated $XJCl_3$ strain. Control animals were inoculated with normal mouse brain homogenate. The animals were controlled daily, weight and mortality being registered. Inoculated and control animals were killed by bleeding at different days post infection (pi) and samples of blood and organs were taken for virological, histological and histochemical assays. Mortality was 100 % for the animals inoculated with the pathogenic XJ strain and death occurred between days 11 and 14 pi. For the MC_2 strain, mortality was 76 % and death occurred between 14 and 26 days pi. For the $XJCl_3$ strain, mortality was 16 %; roughly 3/4 died during the third and fourth week pi, whereas the remainder died as late as 6 weeks pi (Fig. 1). Figures 2 and 3 show that viral spread was more extended, exhibited higher titers and occurred earlier with the pathogenic XJ than with any of the attenuated strains. No virus could be recovered from CNS of animals inoculated with XJ, although viremia was present and no antibodies were produced. Among animals inoculated with MC_2, viral spread was slower and titers were lower compared with the more attenuated $XJCl_3$. Virus was detected in CNS for both attenuated strains and was coincident with the presence of antibodies (Fig. 3). No viremia was detected with either strain. With the XJ strain, lesions were present in liver, lymphatic tissue, lung and bone marrow in all the animals examined. Lesions were very intense in all the organs, with necrosis in bone marrow and lymphatic tissue (Figures 7 and 8). Viral antigen was present in kidney, lymphatic tissue (Figure 9), bone marrow, liver, lung and pancreas (Table 1). Among guinea pigs infected with MC_2, CNS lesions were remarkable and virus levels high. Lesions were also present in pancreas, salivary gland, lung and liver (Fig. 6). Antigen was present in pancreas, lymphatic tissue, lung and cerebrum. Animals infected with $XJCl_3$ showed lesions in CNS (Fig. 5), but virus was recovered in low titers, if at all. They also showed lesions in pancreas. (Fig. 4), salivary gland and lung. Antigen was seen in pancreas, lymphatic tissue and cerebrum (Fig. 10). These results suggest that a different physiopathology might be involved in the disease and death of the animals inoculated with these three strans, as tissue tropism varies according to the strain of virus inoculated. In order to differentiate these strains (Table 2), some other parameters may be considered, besides mortality: a) *differences in the mean day of death (12 for XJ, 21 for MC_2 and 25 for $XJCl_3$);* b) *absence of viremia and presence of antibodies only among animals inoculated with attenuated strains;* c) *presence of intense lesions in lymphohemopoietic tissue only with the XJ strain, and* d) *absence of virus, lesions and antigen in CNS of animals inoculated with XJ, which are present with the attenuated strains.*

Agradecimientos: Este trabajo se realizó con aportes financieros de CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), SECYT (Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología) y Fundación Emilio Ocampo.

Bibliografía

1. Avila MM, Samoilovich SR, Weissenbacher MC: Infección del cobayo con la cepa ate-

nuada del virus Junin XJCl3. *Medicina (Bs Aires)* 39: 597, 1979.
2. Berría MI, Gutman Frugone L, Girola R, Barrera Oro JG: Estudios inmunológicos con virus Junin. Formación de anticuerpos en cobayos inoculados con virus vivo. *Medicina (Bs Aires)* 27: 93, 1966.
3. Boxaca MC, Parodi AS, Ruggiero H, Blay R: Fiebre Hemorrágica experimental en el cobayo (virus Junin). *Rev Soc Arg Biol* 37: 170, 1961.
4. Carballal G, Cossio P, Laguens R, Arana R, Ponzinibbio C, Cabeza Meckert PM: Pathology of lympathic and haemopoietic tissue in guinea pigs infected with Junin virus. *J Infect Dis* (en prensa).
5. Cintora A: Formas clínicas en la Fiebre Hemorrágica Argentina. *Ciencia e Investigación* 33: 255, 1977.
6. Contigiani MS, Sabattini MS: Virulencia diferencial de cepas de virus Junin por marcadores biológicos en ratones y cobayos. *Medicina (Bs Aires)* 37, Supl. 3: 244, 1977.
7. Giovanniello OA, Boxaca MC: Effect of cyclophosphamide on Junin virus infection in mice. *Medicina (Bs Aires)* 33: 368, 1973.
8. Guerrero LB de, Weissenbacher MC, Parodi AS: Inmunización contra la FHA con una cepa atenuada del virus Junin. Estudio de una cepa modificada del virus Junin. Inmunización de cobayos. *Medicina (Bs Aires)* 29: 1, 1969.
9. Guerrero LB de, Boxaca MC, Weissenbacher MC, Frigerio MJ: Infección experimental del cobayo con virus Junin. Cuadro clínico, diseminación y eliminación del virus. *Medicina (Bs Aires)* 37: 271, 1977.
10. Reed LJ, Muench HA: A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am J Hyg* 27: 493, 1938.
11. Ruggiero H, Cintora FA, González Cambaceres C, Milani HA, Magnoni C, Astarloa L, Maglio F, Pérez Izquierdo F: Inmunización contra la FHA con una cepa atenuada de virus Junin. Análisis de 636 vacunados. *Prensa Méd Argent* 61: 231, 1974.
12. Schmuñis G, Weissenbacher MC, Parodi AS: Tolerance to Junin virus in thymectomized mice. *Arch ges Virusforch* 21: 200, 1967.
13. Weissenbacher MC, Guerrero LB de, Frigerio MJ: Infección subclínica, infección clínica y vacunación con virus Junin. *Medicina (Bs Aires)* 36: 1, 1976.
14. Weissenbacher MC, Coto CE, Calello MA: Cross protection between Tacaribe complex virus. Presence of neutralizing antibodies against Junin virus (AHF) in guinea pigs infected with Tacaribe virus. *Intervirology* 6: 42, 1975-76.

- - - -

De là vient que par une prérogative particulière, non seulement chacun des hommes s'avance de jour en jour dans les sciences, mais que tous les hommes ensemble y font un continuel progrès a mesure que l'univers viellit.

De donde surge que por una prerrogativa particular, no sólo cada uno de los hombres avanza día a día en las ciencias, sino que todos los hombres juntos llevan a un progreso continuado a medida que el universo envejece.

BLAISE PASCAL (1623-1662)

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 167-172 (1981)

ANTIGENOS RIBOSOMALES DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

REACTIVIDAD ANTIGENICA DEL COMPONENTE PROTEICO

R. LOPETEGUI, CORA SOSA MIATELLO

Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

En un trabajo anterior se demostró que ribosomas citoplasmáticos de epimastigotes *Trypanosoma cruzi* y sus fracciones sedimentada y soluble a 105 000 g, contenían determinantes antigénicos comunes. Asimismo la reactividad de estos antígenos con antisueros de conejos infectados experimentalmente con tripomastigotes *T. cruzi* indicaron la intervención de antígenos comunes y/o relacionados [9]. La participación del ARN integrante del ribosoma y de su fracción sedimentada a 105 000 g se evidenció por el descenso parcial de aproximadamente 50 % de su reactividad antigénica por tratamiento con RNAsa pancreática. Este descenso de reactividad se manifestó tanto en antisueros específicos y relacionados, como en sueros de conejos infectados experimentalmente con tripomastigotes *T. cruzi* [9]. Es de interés demostrar la reactividad antigénica del integrante proteico del ribosoma y de su fracción sedimentada a 105 000 g, con los antisueros antes mencionados. Para ello se comenzó estudiando la degradación enzimática producida por dos proteasas: tripsina y papaína. Se ensayó luego la extracción con 2-cloroetanol de las proteínas integrantes de ambos antígenos [5, 14] y su capacidad detectora de anticuerpos fijadores de complemento en antisueros de conejos inyectados con antígenos ribosomales, con homogeneizado total de los parásitos y de conejos infectados experimentalmente con *T. cruzi*.

Material y métodos

Antígenos: Ribosomas citoplasmáticos (R) de epimastigotes *Trypanosoma cruzi*, cepa Tulahuen, provenientes de cultivo en medio bifásico recolectados en período de crecimiento exponencial, lavados y sedimentados por un método ya descripto [8]; la preparación de ribosomas está especificada en un trabajo anterior [8]. Ribosomas sedimentados a 105 000 g, 210 minutos (sed R), en una solución hipertónica en presencia de EDTA y a pH 7.40 [8].

Análisis químico de los antígenos: ARN se determinó aplicando el método de Fleck y Begg para su extracción e hidrólisis [4]; la ribosa se valoró por la reacción colorimétrica con orcinol [3]. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry y col. [10].

Inmunización de conejos con antígenos ribosomales: El esquema de inmunización utilizado, así como la preparación y conservación de los inmunosueros obtenidos, fue descripta anteriormente [9]. Las dosis totales inyectadas fueron: antígeno R, ARN 5.45 mg, proteínas 4.91 mg; sed R, ARN 5.37 mg, proteínas 0.39 mg.

Inmunización de conejos con homogeneizado total (HT) de epimastigotes T. cruzi: Se realizó con el mismo esquema, vías de inyección y secuencia especificados para los antígenos ribosomales, variando las cantidades totales inyectadas: ARN 6.00 mg, proteínas 70.2 mg.

Recibido: 17-XII-1980. Aceptado: 11-III 1981.

Dirección postal: Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, piso 13, 1121 Buenos Aires, Argentina.

Antisueros de conejos infectados experimentalmente con tripomastigotes T. cruzi: Se obtuvieron de acuerdo a lo especificado en un trabajo anterior [9].

Degradación enzimática de las proteínas ribosomales de los antígenos R y sed R: Se utilizó: *a*) Tripsina pancreática tipo I (Sigma) en proporción de 20 μg de enzima por cada 100 μg de proteína; la hidrólisis enzimática se realizó a pH 7.00, a 37° C durante 60 minutos, utilizando 20 μg de inhibidor de tripsina (Sigma tipo II 0) para interrumpir la reacción. Como sustrato de referencia se usó una solución de caseína al 1 % [7]. Previamente se comprobó la ausencia de ribonucleasa contaminante en la tripsina utilizada por el método de Hotchkiss [6]; se usó como sustrato una solución de ARN de levadura purificada tipo XI (Sigma), a la que se le añadió tripsina en la misma concentración que los ensayos y manteniendo las mismas condiciones de pH, temperatura y tiempo de incubación. No se obtuvo incremento en las absorbancias medidas a 260 nm; *b*) Papaína cristalizada en proporción de 1 μg por cada 100 μg de proteína; la hidrólisis enzimática se realizó en presencia de clorhidrato de cisteína 0.005 M como activador y EDTA 1.5 mM, en solución buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 8.00, incubando a 37° C durante 60 minutos. Se utilizó ácido tricloroacético al 5 % para interrumpir la reacción. Como sustrato de referencia se usó una solución de caseína al 1 % [1].

Se determinaron las proteínas de los antígenos ribosomales antes y después de los tratamientos enzimáticos, por el método de Lowry y col. [10]. Simultáneamente se valoró el ARN por la metódica antes citada [3, 4].

Extracción de proteínas ribosomales con 2-cloroetanol: Ribosomas preparados a partir de 3-4 g de epimastigotes *T. cruzi* por la metódica ya citada [8], disueltos en 1.20 volúmenes de ClNa 0.20 M, Tris 0.01 M (pH 7.40), EDTA 0.01 M, se trataron con 5 volúmenes de 2-cloroetanol llevando a acidez 0.06 N con HCl concentrado [5]. Después de 2 horas el ARN precipitado se separó por centrifugación a 10 000 rpm, 10 minutos. El sobrenadante se dializó contra 200 ml de agua destilada llevada a pH 7.40 con PO_4HNa_2 hasta concentración 2.4 mM, cambiando la solución de diálisis tres veces, cada ocho horas. La solución de proteínas ribosomales contenida en el saco de diálisis se concentró con polivinilpirrolidona (50 g/50 ml) hasta aproximadamente la mitad del volumen. Por centrifugación de la solución concentrada a 3000 rpm, 5 minutos, se separó el sobrenadante. Se lavó el precipitado remanente con la solución de diálisis en un volumen 5 veces menor que la solución inicial; se separó el sobrenadante por centrifugación a 3000 rpm, 5 minutos y se añadió al anterior. Toda la operación se condujo a 2°-4° C. Se ensayaron ARN y proteínas en el *pool* de soluciones; los valores expresados en mg/g de epimastigotes húmedos de origen se utilizaron para calcular el porcentaje de proteínas ribosomales extraídas por 2-cloroetanol.

La solución de proteínas ribosomales se liofilizó, y se mantuvo a −70° C hasta el momento de su utilización. Para ensayar la reactividad antigénica de estas proteínas ribosomales, se reconstituyó la solución con volúmenes variables de agua destilada para obtener una concentración proteica de 50 μg/ml.

Idéntico procedimiento se aplicó para separar las proteínas ribosomales de la fracción del ribosoma sedimentado a 105 000 g.

Reacciones serológicas: Los anticuerpos fijadores de complemento de los antisueros de conejos inyectados con antígenos ribosomales R y sed R de epimastigotes *T. cruzi* y con homogeneizado total (HT) de parásitos, así como los de inmunosueros de conejos infectados experimentalmente, se ensayaron con los antígenos ribosomales de origen y con las proteínas extraídas con 2-cloroetanol. En todos los casos los antígenos utilizados contenían una concentración constante de proteínas: 50 μg/ml. Para la reacción de fijación de complemento se usó la técnica de Palczuk y col. [12], aplicando el procedimiento de Plescia y col. [13] para la sensibilización de eritrocitos de carnero y el de Mayer y col. [11] para la titulación del sistema hemolítico. La reactividad antigénica se ensayó en cada caso frente a diluciones de los antisueros respectivos que fijaran aproximadamente el 50 % de complemento con los antígenos originales. Los resultados se expresaron en por ciento de complemento fijado.

Resultados

La degradación de proteínas de los antígenos ribosomales de epimastigotes *T. cruzi* con tripsina, mostró diferencias cuantitativas, comparadas con la de caseína que se usó como sustrato de referencia. En las condiciones experimentales especificadas en Material y métodos, se consiguió una hidrólisis del 85 % de las proteínas de la caseína, a diferencia de las proteínas del ribosoma (R) que se degradaron el 40 % y las proteínas del sedimento ribosomal (sed R) el 19 % (Tabla 1).

Paralelamente al descenso de proteínas, se produjo una marcada pérdida del integrante ribonucleico de los antígenos ribosomales, alcanzando a 78 % y 65 % el descenso de ARN del ribosoma (R) y del sedimento ribosomal (sed R), respectivamente.

Ensayos previos en los que se utilizaron concentraciones menores de tripsina 5 % y 10 %, produjeron un grado de hidrólisis proteica menor, tanto en el sustrato de referencia como en los ensayos, manifestándose también en éstos la misma dife-

TABLA 1. — *Acción de tripsina sobre antígenos ribosomales de* Trypanosoma cruzi *

Degradación de proteínas			Decenso de ARN	
Sustrato de referencia	Antígenos ribosomales		Antígenos ribosomales	
Caseína	Ribosoma (R)	Sedimento ribosomal 105 000 g (sed R)	Ribosoma (R)	Sedimento ribosomal 105 000 g (sed R)
85 % ↓	40 % ↓	19 % ↓	78 % ↓	65 % ↓

* Tratamiento con tripsina: 20 % respecto de las proteínas de cada sustrato; pH 7.00, 37° C, 60 minutos. Prom. de 5 exp.

rencia con respecto a la caseína y los mismos descensos progresivos del contenido de ARN.

Los ensayos de proteolisis enzimática con otra enzima, papaína, mostraron un grado mayor de degradación de las proteínas del ribosoma, comparada con la acción de la tripsina, manifestándose también el descenso paralelo del ARN ribosomal (Tabla 2). No se prosiguió el ensayo con el sedimento ribosomal, por la degradación similar al ribosoma manifestada con el uso de tripsina.

Por los resultados obtenidos, se desechó el uso de enzimas proteolíticas para estudiar la participación del componente proteico en los antígenos ribosomales del *T. cruzi.*

El tratamiento con 2-cloroetanol, permitió extraer proteínas ribosomales de los antígenos R y sed R: 38 % (Prom. de 3 preparaciones) y 95 % (Prom. de 3 preparaciones), respectivamente. En ninguno de los extractos proteicos se detectó ARN.

La actividad antigénica de las proteínas ribosomales extraídas de R y sed R ensayadas comparativamente con la de los antígenos originales, por la reacción de fijación de complemento frente a antisueros de conejos inyectados con R, sed R, homogeneizado total del parásito (HT) y con antisueros de conejos infectados experimentalmente, está representada en las Figuras 1 y 2.

TABLA 2. — *Acción de papaína sobre antígeno ribosomal de* Trypanosoma cruzi *

Degradación de proteínas		Descenso de ARN
Sustrato de referencia Caseína	Ribosoma (R)	Ribosoma (R)
95 % ↓	69 % ↓	76 % ↓

* Tratamiento con papaína: 1 % respecto de las proteínas de cada sustrato; pH 8.00, 37° C, 60 minutos. Prom. de 2 exp.

Las proteínas ribosomales extraídas con 2-cloroetanol del antígeno R, disminuyeron su capacidad detectora de anticuerpos fijadores de complemento respecto de los antígenos de origen cuando se ensayaron con los antisueros anti-R y anti-sed R: 59 % y 40 %, respectivamente; este descenso aumentó significativamente con los antisueros anti-HT y los de conejos infectados, llegando a 90 % y 95 %, respectivamente (Fig. 1).

Las proteínas ribosomales extraídas con 2-cloroetanol del antígeno sed R, manifestaron escasa o nula capacidad detectora de anticuerpos fijadores de complemento de los antisueros antes mencionados; el descenso producido respecto del antígeno de origen fue de 99 %, 91 %, 100 % y 100 %, respectivamente, con los antisueros anti-R, anti-sed R, anti-HT, y de conejos infectados (Fig. 2).

Discusión

En el estudio de ribosomas de epimastigotes *Trypanosoma cruzi* y de una fracción ribosomal sedimentada a 105 000 g, como antígenos detectores de anticuerpos fijadores de complemento frente a antisueros de conejo específicos, relacionados y de sueros de conejos infectados experimentalmente con *T. cruzi,* pudo demostrarse que el tratamiento previo de los antígenos con ribonucleasa producía una disminución de la actividad detectora de

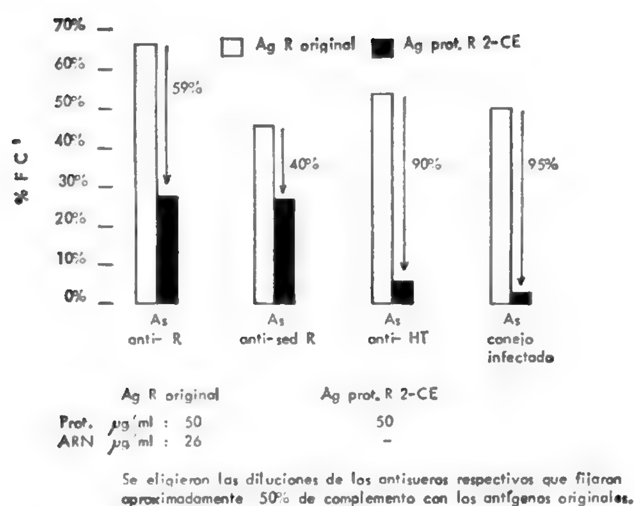


Fig. **1.** — Actividad fijadora de complemento de proteínas ribosomales extraídas con 2-Cloroetanol de antígeno ribosomal (R) de **Trypanosoma cruzi.**

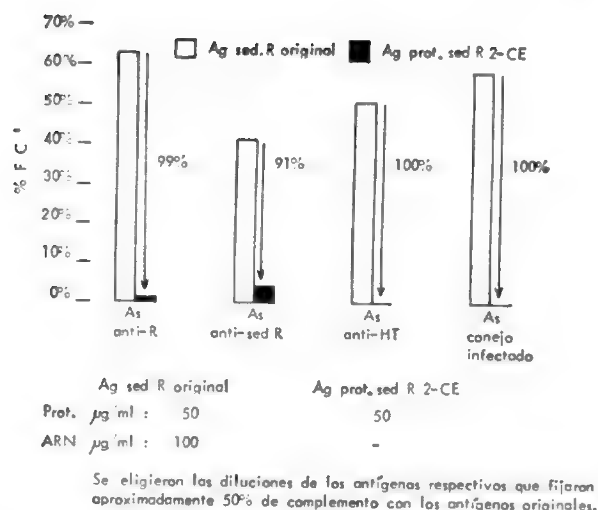


Fig. **2.** — Actividad fijadora de complemento de proteínas ribosomales extraídas con 2-Cloroetanol de antígeno ribosomal sedimentado a 105 000 g (sed R) de **Trypanosoma cruzi.**

alrededor de 50 % [9]; este hecho evidenciaba la participación del ARN de los antígenos citados. Las tentativas para estudiar la participación del componente proteico con el uso de proteinasas, resultaron infructuosas. El tratamiento de los antígenos ribosomales con tripsina y papaína no solamente produjo una hidrólisis insuficiente de las proteínas integrantes sino que produjo también una degradación parcial del ARN. Tal comportamiento derivaría de la presencia de fosforilasas contaminantes del ribosoma, liberadas por acción de las proteinasas [15]. La separación del integrante proteico de la macromolécula ribosomal libre de ARN, se consiguió por extracción del ribosoma y del sedimento ribosomal 105 000 g con 2-cloroetanol. Este disolvente añadido al 83 % en solución acuosa y en medio ácido, mantiene adecuadamente la estructura proteica [14]. Fogel y Sypherd [5] consiguieron una extracción del 90 % de las proteínas ribosomales de *E. coli* con 2-cloroetanol. En el caso aquí descripto, la extracción de proteínas del ribosoma de *T. cruzi* resultó inferior, 40 % aproximadamente. El sedimento ribosomal 105 000 g contiene proteínas más solubles en el alcohol clorado ácido, ya que se extrajeron el 90 %-100 %. Se sugiere que existen diferencias entre las diversas proteínas integrantes, sean del ribosoma o de la fracción sedimentada a 105 000 g, en cuanto a su solubilidad en 2-cloroetanol. El integrante proteico del ribosoma (R) usado como antígeno detector de anticuerpos fijadores de complemento de antisueros anti-R y anti-sed R, actuaron en proporción del 50 %, aproximadamente. Estos hechos demostrarían que la reactividad antigénica del ribosoma de *T. cruzi* derivaría de la suma de los componentes nucleico y proteico en proporción similar. Frente al antisuero anti-HT, el integrante proteico del antígeno R, al actuar en proporción del 10 % con respecto al ribosoma de origen, indicaría una respuesta pobre a la proteína ribosomal cuando se inmunizó con el homogeneizado total del parásito; este hecho puede atribuirse a un fenómeno de competencia de antígenos [2], ya que los conejos inmunizados con R y sed R recibieron inmunógenos con una relarión proteínas/ARN de 0.90 y 0.07, respectivamente, mientras que en los inmunizados con HT esa relación fue de 11.7. La muy baja reactividad antigénica del integrante proteico del antígeno R con el suero de conejo infectado, 5 % con respecto al ribosoma de origen, resulta de difícil explicación en el estado actual de estas investigaciones. La proteína del sedimento ribosomal 105 000 g (sed R) no manifestó actividad detectora de anticuerpos fijadores de complemento con antisueros anti-R, anti-HT y con suero de conejo infectado; presentó muy débil reactividad con el antisuero anti-sed R, el 9 % con respecto al antígeno sed R de origen.

De estos resultados puede inferirse que las proteínas integrantes del sed R que

son fácilmente solubles en 2-cloroetanol tienen reactividad antigénica muy baja o nula, y se corresponderían a proteínas estructurales no enzimáticas de naturaleza básica y pobre inmunogenicidad.

Los resultados obtenidos con antígeno sedimento ribosomal 105 000 g (sed R) tratados con RNAsa, que degradaban el componente ARN en un 90 %, mostraron que el 10 % remanente mantenía aproximadamente el 50 % de reactividad [9]; siendo que la fracción proteica no manifestó reactividad antigénica, se sugiere que el 10 % de ARN no sensible a la RNAsa, presentaría igual actividad que el 90 % del ARN sensible a la RNAsa. De estos hechos se podría deducir que la fracción nucleica RNAsa resistente es 10 veces más activa que el ARN RNAsa sensible.

Resumen

Se estudió la participación del integrante proteico de antígenos ribosomales de epimastigotes de Trypanosoma cruzi, *cepa Tulahuen, en su reactividad antigénica. Los citados antígenos fueron sometidos a proteolisis enzimática con tripsina y papaína. Ambas enzimas produjeron una degradación parcial de las proteínas ribosomales y paralelamente una apreciable degradación del ARN, entre 65 % y 80 %, aproximadamente. Estos hechos invalidaron la utilización de enzimas proteolíticas para los fines propuestos. La extracción de las proteínas ribosomales integrantes de los antígenos en estudio con 2-cloroetanol, resultó de 40 % y 95 % (valores promedio) para ribosomas (R) y sedimento ribosomal 105 000 g (sed R), respectivamente. No se detectó ARN en ninguno de los extractos proteicos. Los ensayos de reactividad antigénica de las proteínas extraídas con 2-cloroetanol se realizaron por reacción de fijación de complemento con antisueros de conejos inyectados con R, sed R y homogeneizado total (HT) de epimastigotes* T. cruzi *y con inmunosueros de conejos infectados experimentalmente con tripomastigotes* T. cruzi. *Los anticuerpos fijadores de complemento de los antisueros anti-R y anti-sed R fueron detectados por las proteínas extraídas del ribosoma entre 40 % y 60 %, mientras que los de animales inmunizados con homogeneizado total y los de los infectados experimentalmente manifestaron débil reactividad, 10 % y 5 %. Tanto los antisueros anti-R, anti-sed R, anti-HT como los sueros de animales infectados, no reaccionaron o lo hicieron muy débilmente cuando se utilizaron las proteínas extraídas del sedimento ribosomal 105 000 g como antígeno detector. Habiéndose ya demostrado la participación del componente ARN en la reactividad antigénica de los antígenos ribosomales de epimastigotes* T. cruzi *en un 50 % aproximadamente, puede inferirse que el integrante proteico del antígeno R mantiene la reactividad de aproximadamente 50 % frente a los antisueros específicos y relacionados, mientras que las proteínas extraídas por 2-cloroetanol del sed R no presentaron reactividad antigénica frente a ninguno de los antisueros ensayados.*

Summary

RIBOSOMAL ANTIGENS OF *Trypanosoma cruzi*. ANTIGENIC REACTIVITY OF THE PROTEIN COMPONENT.

The antigenic reactivity of ribosomal antigens protein components of Trypanosoma cruzi *epimastigotes, Tulahuen strain, was studied. Trypsin and papain was used for enzymatic proteolysis of these antigens. Partial degradation of ribosomal proteins were obtained with both enzymes and paralelly 65 %-80 % approximately of RNA was degradated. For these reasons the use of proteolytic enzymes resulted inadequate for our purposes. 40 % and 95 % of the ribosomal proteins were extracted with 2-chloroethanol (2-CE) from the treated ribosomes and the 105 000 g fraction, respectively. RNA could not be detected in both protein extracts. Complement fixation test was used for antigenic reactivity of 2-CE protein extracts against antisera of rabbits injected with ribosomes (R) 105 000 g sedimented fraction (sed R), total homogenate (HT)* T. cruzi *epimastigotes and experimentally infected rabbit sera. Ribosomes-2-CE-proteins extracted 40 %-60 % of serum antibodies in anti-R and anti-sed R rabbit sera, and 10 %-*

5 % of serum antibodies in anti-HT and infected rabbit antisera. All antisera resulted very weakly reactive or not reactive, when tested with sed R-2-CE-proteins extracted. Since it has been demonstrated that RNA component has 50 % of R and sed R antigenic reactivity against specific and related antisera, these results suggest that ribosomes-2-CE-proteins extracted are involved in 50 % of reactivity. Sed R-2-CE-proteins extracted, have no antigenic reactivity against all antisera tested.

Agradecimientos: Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Comisión para el Estudio Integral de la Enfermedad de Chagas y subvencionado con fondos del Subsidio nº 8641/79-2 distribuido por el CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), perteneciente al Programa de Investigación sobre la Enfermedad de Chagas-Mazza, de la Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología. Nuestro agradecimiento a la Srta. Emma Raquel Fiorotto por su valiosa ayuda técnica.

Bibliografía

1. Arnon Ruth: Methods in Enzymology. Collowick y Kaplan Eds. Vol. XIX, Academic Press, New York and London, 1970, p. 226.
2. Boyd WC: Fundamentos de Inmunología. EUDEBA, Buenos Aires, 1963, p. 101.
3. Chargaff E, Davidson JN: The nucleic acids. Vol. 1, Academic Press, New York, 1955, p. 301.
4. Fleck A, Begg DG: The estimation of ribonucleic acid using absorption measurements. *Biochim Biophys Acta* 108: 333, 1965.
5. Fogel S, Sypherd PS: Extraction and isolation of individual ribosomal proteins from *Escherichia coli. J Bacteriol* 96: 358, 1968.
6. Hotchkiss RD: *In* Methods in Enzymology. Collowick, Kaplan (eds) vol. II, Academic Press, New York, 1955, p. 708.
7. Laskowski M: *In* Methods in Enzymology. Collowick, Kaplan (eds) vol. II, Academic Press, New York, 1955, p. 32.
8. Lopetegui R, Sosa Miatello Cora: Ribosomas citoplasmáticos de *Trypanosoma cruzi.* Características químicas y antígeno-reactivas. *Medicina (Bs Aires)* 37: 371, 1977.
9. Lopetegui R, Sosa Miatello Cora: La Via María Inés: Antígenos ribosomales de *Trypanosoma cruzi.* Efecto de ribonucleasa sobre su reactividad antigénica. *Medicina (Bs Aires)* 40, supl. 1: 91, 1980.
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr HL, Randall LJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265, 1951.
11. Mayer M, Croft Ch, Gray M: Kinetic studies on immune hemolysis. *J Exp Med* 88: 427, 1948.
12. Palczuk NC, Plescia OJ, Braun W: Studies on DNAsa sensitive antigens of *Brucella abortus* by complement fixation. *Proc Soc Exp Biol Med* 107: 982, 1961.
13. Plescia OJ, Amirian K, Heidelberger M: Aspect of the immune hemolytic reaction. I. Dependence of the extent of hemolysis on concentrations reactants. II. Effects of composition of C' on concentration dependence in immune hemolysis. *J Immunology* 78: 147, 1957.
14. Sohli NJ, Herskovits TT: Solvent perturbation studies and analysis of protein and model compound data in denaturing organic solvents. *Analit Biochem* 54: 370, 1973.
15. Spirin AS: *In* Progress in Biophysics and Molecular Biology. J. A. V. Butler, D. Noble (eds), vol. XIX, Pergamon Press, Oxford, 1969, p. 135.

— — — —

Pour être bien connues les choses doivent être connues en détail, et comme les détails sont presque infinis, notre connaissance est toujours superficielle et imparfaite.

Para ser bien conocidas las cosas deben ser conocidas en detalle, y como los detalles son casi infinitos, nuestro conocimiento es siempre superficial e imperfecto.

La Rochefoucauld (1613-1680)

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 173-176 (1981)

UTILIDAD DEL METODO DE INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS EN LA DETECCION DE POSIBLES AGENTES MUTAGENICOS

MARTA D. MUDRY DE PARGAMENT *, MABEL LABAL DE VINUESA *, IRENE LARRIPA **, SONIA BRIEUX DE SALUM **, O. COLILLAS

Departamento de Cultivo de Tejidos y Citogenética, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, y Centro Argentino de Primates, Buenos Aires

El intercambio de cromátides hermanas (ICH) involucra la ruptura en puntos idénticos de ambas cromátides con posterior intercambio y reparación, sin pérdida de ADN ni cambios en la morfología cromosómica. El ICH se visualiza como una tinción diferencial de dichas cromátides, cuando se exponen células en división a la acción de la 5-bromodeoxiuridina, durante 2 ciclos celulares [11]. En la actualidad, varios grupos de investigación sugieren que la frecuencia de ICH es un excelente indicador para seleccionar mutágenos y carcinógenos por ser un método más sensible que la valoración de aberraciones cromosómicas [1]. En los últimos años, la población humana se ha visto expuesta a numerosas sustancias que producen daño al material genético por sus propiedades mutagénicas, entre las que se incluyen drogas terapéuticas de uso general y prolongado como vitaminas, anti-inflamatorios, tranquilizantes, anticonceptivos orales y medicamentos antiparasitarios [5]. A comienzos de 1950, se iniciaron los estudios tendientes a sintetizar antihelmínticos activos de amplio espectro y carentes de toxicidad abarcando entre otros, compuestos de tipo benzoimidazol y derivados. En este trabajo hemos tomado al tiabendazol (Fig. 1) como fármaco con actividad so-

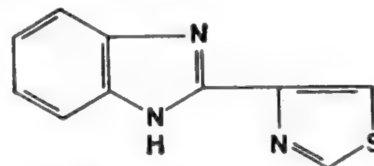


Fig. 1. — Fórmula estructural del tiabendazol.

bre los distintos parásitos que afectan a hongos, ciertos vegetales, diversos animales y al hombre. Como modelo experimental, hemos elegido una especie de mono neotropical llamada *Saimiri sciureus* por ser un mono de fácil manejo, de cariotipo estudiado en nuestro Laboratorio [13], así como en otros grupos de trabajos [4, 7, 12, 17], y por contar con una población homogénea que asegure una futura provisión de ejemplares para estudios biológicos.

Material y métodos

Se aplicó la técnica de ICH en cultivo de linfocitos de sangre periférica de 7 ejemplares

Recibido: 10-XII-1980. Aceptado: 4-III-1981.

* Becaria del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET.

Dirección postal: Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina.

de la especie *Saimiri sciureus* oriundos de Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Este número de animales (7) fue elegido por constituir ellos una misma partida, lo que facilitó el estudio simultáneo de ambos grupos. Fueron dejados sin tratamiento antiparasitario 3 de ellos y 4 tratados con tiabendazol, con una dosis oral de 40 mg/kg/día, durante 5 días, tomada como mitad de la dosis terapéutica.

Los linfocitos de sangre periférica fueron cultivados durante 72 hs a 37° C [3] en medio de cultivo F10 suplementado con 15 % de suero fetal bovino y fitohemaglutinina P (PHA) como mitógeno. A los cultivos se les adicionó 10 μg/ml de 5-bromodeoxiuridina (BUDR) y se dejaron crecer en completa oscuridad para evitar la fotólisis del BUDR. Una hora antes de sacrificar el cultivo, se agregó colchicina 1 μg/ml para detener el mayor número de células en metafase; luego, se realizó la hipotonía con ClK al 0.53 % y, finalmente, 3 cambios de fijador (Ac. acético, alcohol metílico 1:3).

Los extendidos cromosómicos se realizaron por secado al aire y luego fueron procesados de acuerdo a la técnica de Perry y Wolff para visualizar el ICH [15].

En los animales tratados, se determinó el número de intercambios por célula analizando 20 metafases por ejemplar. En el grupo control se estudiaron hasta 10 metafases en cada individuo. Para valorar los resultados se aplicó análisis de varianza [2].

Resultados

Fueron comparadas las medias de ICH por célula obtenidas en ambos grupos de ejemplares.

Para el grupo control se obtuvo un valor de ICH/metafase de $\overline{X} \pm ES = 5.6 \pm 0.3$ y para el grupo tratado $\overline{X} \pm ES = 8.7 \pm 0.3$ (Tabla 1).

TABLA 1. — *Valoración del incremento de cromátides hermanas (ICH)*

Grupo estudiado	Nº de células analizadas	$\overline{X} \pm$ E.S
Control (3)	25	5.6 ± 0.3 [a]
Tratado (4)	80	8.7 ± 0.3 [a]

[a] $p < 0.01$.

La aplicación del análisis de varianza demostró que existían entre ambos, diferencias altamente significativas ($p < 0.01$).

En la Figura 2, se encuentra graficada la distribución de ICH por célula, en ambos grupos, donde se observa que para

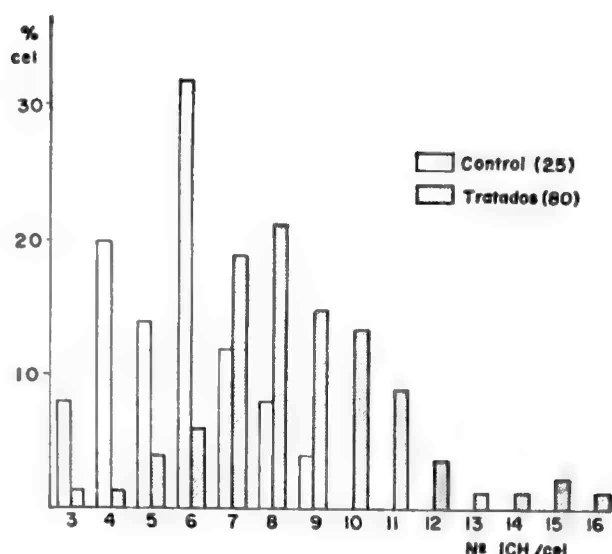


Fig. 2. — Distribución del intercambio en ambos grupos.

el grupo control un 32 % de las células mostraron 6 intercambios. En el grupo tratado, a pesar de la gran dispersión, se observó un 21 % de células con 8 intercambios.

Discusión

En los últimos años han aumentado en forma significativa, los estudios tendientes a investigar los efectos de distintos medicamentos. Varias son las pruebas biológicas que se utilizan en la valoración de estas drogas. En este trabajo, se ha empleado la técnica de ICH por ser un excelente indicador para seleccionar mutágenos y ser más sensible que los métodos convencionales de aberraciones cromosómicas [9]. Su alta sensibilidad y relativa simplicidad hizo que la prueba de ICH se incorporara a los protocolos de investigación para detección de agentes mutagénicos en general, así como de elementos cancerígenos o que introduzcan daño cromosómico [8, 10, 14, 16].

Muchos son los medicamentos que actúan como elementos mutagénicos y que están considerados como inocuos y permitido su consumo general y prolongado, que han demostrado producir efectos adversos en sistemas experimentales no humanos [6]. El estudio efectuado con tiabendazol permite demostrar un incremento en la inestabilidad cromosómica dado por

el número de roturas y reparaciones en el ADN de los ejemplares tratados. La valoración estadística, comparando monos controles y tratados, presentó diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) corroborando de esta manera el efecto clastogénico de esta droga o de sus metabolitos derivados. Esta prueba aplicada en modelos no humanos, permite evaluar la acción mutagénica de drogas. Si consideramos al primate como el animal filogenéticamente más cercano, el hombre debería tener en cuenta las observaciones realizadas en dicho modelo experimental junto a los resultados obtenidos en otros niveles de investigación.

El empleo de medicamentos por parte de la población, si pensamos que una misma persona puede recibir más de un tratamiento o bien automedicarse, es elevado, con lo que es posible sugerir que la metodología de ICH podría incorporarse al esquema de pruebas de rutina para el análisis de los fármacos de consumo masivo. En consecuencia, cualquier agente capaz de inducir alteraciones detectables con esta metodología, debería considerarse de riesgo potencial para el hombre.

Resumen

Se realizó el estudio citogenético, aplicando la prueba de ICH, para valorar el efecto del tiabendazol, fármaco ampliamente utilizado como antiparasitario. Se estudiaron 4 monos de la especie Saimiri sciureus, *provenientes de Santa Cruz de la Sierra (Bolivia), tratados con dosis que corresponden a la mitad de la dosis terapéutica (40 mg/kg/día durante 5 días) y 3 ejemplares vírgenes de tratamiento, de igual origen geográfico, considerados controles de los anteriores. La media de ICH de los ejemplares tratados fue de 8.7 ± 0.3, mientras que la media de ICH de los ejemplares controles fue de 5.6 ± 0.3. La valoración estadística demostró la existencia de diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) indicando un efecto clastogénico de la droga o de sus derivados. Si la droga es clastogénica debe tenerse en cuenta que existe un riesgo potencial para la población tratada con dicho producto químico.*

Summary

USEFULNESS OF THE SISTER CHROMATID EXCHANGE METHOD FOR THE DETECTION OF MUTAGENIC AGENTS.

The incidence of sister chromatid exchange (SCE) in lymphocytes of three Saimiri sciureus *monkeys trapped in Santa Cruz de la Sierra (Bolivia) and the effects of tiabendazol on the SCE incidence in the cells of four others treated with 40 mg/kg/day during five days are presented and discussed. A higher frequency was found in the treated group of monkeys with an average SCE per cell of 8.7 ± 0.3 as compared with 5.6 ± 0.3 for the controls (Table 1). SCE has been proposed as the most sensitive test for mutagenic and/or carcinogenic agents. The use of a SCE score, both banal and as affected by the agents or compounds to which individuals are exposed, may be an important indicator of a potential risk.*

Bibliografía

1. Abe S, Sasaki M: Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *J Natl Cancer Inst* 58: 1625, 1977.
2. Bliss CI: Statistics in Biology. Mc Graw-Hill, New York, 1967.
3. Buckton K, Evans H: Method for the analysis of human chromosome aberrations. WHO Publications, Geneva, 1973.
4. Cambefort I, Moro F: Cytogenetics and taxonomy of some south bolivian monkeys. *Folia Primatol* 29: 307, 1978.
5. Castillo de Sánchez ML: Recomendaciones para la evaluación de los efectos ocasionados por los medicamentos antiparasitarios. *Boletín de la Universidad Nacional Autónoma de México*, p 1, 1980.
6. Espejo O: Estructura química y actividad biológica del metrodinazol. *Boletín de la Universidad Nacional Autónoma de México*, p 21, 1980.
7. García M, Miro R, Ponsá Montserrat M, Egozcue J: Chromosomal polymorphism and somatic segregation in *Saimiri sciureus*. *Folia Primatol* 31: 312, 1979.
8. Gayle Littlefield L, Colyer SP, Sayer AM, Dufrain RJ: Sister-chromatid exchanges in human lymphocytes exposed during G_0 to four classes of DNA damaging chemicals. *Mutation Research* 67: 259, 1979.

9. Kato H, Shimoda H: Sister chromatid exchanges induced by mitomycin C. A new method of detecting DNA damage at chromosomal level. *Mutation Res* 28: 459, 1975.
10. Kram D, Schneider EL, Senula GC, Nakanishi Y: Spontaneous and mitomycin-C induced sister-chromatid exchanges. *Mutation Res* 60: 339, 1979.
11. Latt S: Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Science* 185: 74, 1974.
12. Ma NSF, Jones TC: Added heterochromatin segments in chromosomes of Squirrel Monkeys *(Saimiri sciureus). Folia Primatol* 24: 282, 1975.
13. Mudry de Pargament MD, Larripa I, Brieux de Salum S: Estudios citogenéticos (G-C) e inestabilidad cromosómica (ICH) en una población de *Saimiri sciureus*. XI Congreso de la Sociedad Argentina de Genética, 1980.
14. Nakanishi Y, Schneider EL: In vivo sister chromatid exchange: A sensitive measure of DNA damage. *Mutation Research* 50: 329, 1979.
15. Perry P, Wolff S: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid. *Nature* 251: 256, 1974.
16. Popescu NC, Turnbull D, Di Paolo IA: Sister chromatid exchange and chromosome aberration analysis with the use of several carcinogens and non carcinogens. *J Natl Cancer Inst* 59: 289, 1977.
17. Srivastava PK, Srivastava AK, Lucas FV: Somatic chromosomes of squirrel monkey *(Saimiri sciureus). Primates* 10: 171, 1969.

— — — —

Short, therefore, is man's life, and narrow is the corner of the earth wherein he dwells... The wise man combines the pleasures of the senses and the pleasure of the spirit in such a way as to increase the satisfaction he gets from both. The most valuable thing I have learnt from life is to regret nothing. Life is short, nature is hostile, and man is ridiculous but oddly enough most misfortunes have their compensation and with a certain humour and a good deal of horse-sense one can make a fairly good job of what is after all a matter of very small consequence.

Corta, por ende, es la vida del hombre, y estrecho es el rincón de la tierra donde vive... El hombre sabio combina los placeres de los sentidos con los del espíritu de tal manera que aumenta la satisfacción que obtiene de ambos. Lo más valioso que he aprendido de la vida es no lamentar nada. La vida es corta, la naturaleza es hostil, y el hombre es ridículo pero curiosamente la mayoría de las desgracias tienen sus compensaciones y con cierto humor y mucho sentido común uno puede sacarle bastante provecho a lo que de todas maneras es de muy poca trascendencia.

W. Somerset Maugham (1873-1965)
The narrow corner, 1932

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 177-181 (1981)

INDUCCION DE INTERFERON POR EL VIRUS TACARIBE

BETHY L. AYERRA DE HOLSTEIN, ANGELICA R. TEYSSIE *, L. M. KNECHER, S. R. SAMOILOVICH **, CELIA E. COTO *, MERCEDES C. WEISSENBACHER *

Departamento de Virus, Instituto Nacional de Microbiología Carlos G. Malbrán, Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina y Cátedra de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires

La inoculación de cobayos con virus Tacaribe los protege contra el desafío con virus Junin [3, 11, 16]. Esta protección heteróloga se establece rápidamente y en forma previa a la aparición de anticuerpos neutralizantes [5, 16], por lo que se consideró que su origen se debe a fenómenos de interferencia viral entre los que el interferón podría jugar un papel principal, tal como se ha establecido para otras infecciones virales [2]. En estudios recientes, relativos a sensibilidad y producción de interferón por distintos Arenavirus en cultivos de células humanas y de mono, se ha demostrado que el virus Tacaribe puede ser agrupado entre los más sensibles al mismo [8]. En cambio, en el sistema cobayo, la cepa XJ de virus Junin, podría ser ubicada dentro del grupo de baja sensibilidad si se considera la falta de protección observada por la administración de inductores sintéticos de interferón [15]. En el sistema ratón, la cepa atenuada de virus Junin, $XJCl_3$ demostró ser sensible a la administración de interferón exógeno homólogo ya que se han logrado niveles significativos de sobrevida [1]. Como lo consideran Stephen y col. [13] el papel del interferón en las infecciones con Arenavirus merece ser caracterizado a través de nuevos estudios en distintos modelos animales. Teniendo en cuenta los resultados de protección con virus Tacaribe [5], resulta de interés evaluar específicamente la capacidad inductora de la cepa de virus Tacaribe utilizada en la inmunización, ya que además se ha establecido para virus relacionados, la existencia de capacidades inductoras diferentes según la cepa y el tipo de huésped [10, 12, 14]. En este trabajo se presentan los datos de inducción de interferón por virus Tacaribe en sistemas in vitro: células de pollo; e in vivo: ratón.

Recibido: 17-XII-1980. Aceptado: 11-III-1981.

* Miembro de la Carrera del Investigador Científico del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Becario de la SECYT (Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología).

Dirección postal. Departamento de Virus, Instituto Nacional de Microbiología Carlos G. Malbrán, Vélez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina.

Material y métodos

Virus

Tacaribe: cepa TRLV 11573 mantenida por pasajes a través de cerebro de ratón lactante. Se preparó como un homogenato al 10 % en medio HLS (Hanks-hidrolizado de lactoalbúmina-3 % de suero de ternera inactivado); el título fue $10^{7.3}$ DL_{50}/ml.

NDV: virus de la enfermedad de Newcastle, cepa Hertfordshire, obtenido del laboratorio del Dr. Ch. Chany y mantenido por pasajes en embrión de pollo. El título utilizado fue de 1024

unidades hemaglutinantes por ml (UHA/ml) y 2.2×10^{3} unidades formadoras de placa por ml (UFP/ml) en células de pollo.

VSV: virus de estomatitis vesicular, cepa Indiana, mantenido por pasajes en embrión de pollo o en células L_M. Los títulos utilizados fueron 10^7 y 10^6 $DICT_{50}$/ml.

Animales: ratones machos, cepa Rockland, de 60-70 días de edad y 30 g de peso.

Cultivos celulares: fibroblastos de embrión de pollo: monocapas de cultivos primarios de embrión de pollo (CEP) preparadas en frascos de 90 cc, sembradas con una densidad de 7×10^5 cel/ml, fueron utilizadas a las 72 h de cultivo. Medio de crecimiento: Medio 199 suplementado con 10 % de suero de ternera inactivado (STi). Medio de mantenimiento: Medio 199 suplementado con 2 % STi.

Línea L: línea de células de origen ratón. Monocapas confluentes con una densidad inicial de 5×10^5 células/ml, se utilizaron a las 48 h de desarrollo para titulación de IFN ratón. Medio de crecimiento: Medio 199 suplementado con 10 % STi. Medio de mantenimiento: Medio 199 suplementado con 2 % STi.

Línea RK_{13}: línea continua de riñón de conejo. Se mantuvo por repiques semanales en medio Eagle mínimo (MEM) suplementado con 7 % STi. Se utilizó para titular los virus VSV y Tacaribe.

Inducción de interferón (IFN)

a) *in vitro:* Monocapas de células CEP cultivadas en frascos de 90 cc se dividieron en cuatro series denominadas A, B, C y D utilizando tres frascos por serie. El detalle del experimento se describe en la Tabla 1. La serie A se infectó con virus Tacaribe y a las 24, 48 y 72 h post-infección (pi) se cosechó el sobrenadante para determinar IFN. Inmediatamente las monocapas se desafiaron con virus VSV determinando el rendimiento de este virus 24 horas más tarde. La serie B se infectó sólo con virus Tacaribe y se utilizó para medir el grado de replicación del virus en estas células y determinar si producía efecto citopático. La serie C, no infectada con Tacaribe, fue desafiada con VSV en forma paralela y sirvió como control de producción de VSV. La serie D se utilizó como control de células y sólo sufrió cambios de medio. La infección con cada uno de los virus se realizó por 1 h a 37° retirando el inóculo y lavando luego las monocapas.

Para la obtención de interferón se cosecharon los sobrenadantes como se describió previamente y luego de 5 días a pH 2.0 se dializaron contra buffer fosfato hasta alcanzar neutralidad.

Se ultracentrifugaron a 100 000 × g durante 1 h y el sobrenadante se tituló como interferón.

b) *in vivo:* Se inocularon 32 ratones con 12×10^6 $DICT_{50}$ de virus Tacaribe por vía endovenosa, previa dilatación de los vasos superficiales de la cola con xileno.

Otro grupo de 18 ratones se inoculó de la misma forma con 12×10^6 UFP de virus NDV, como control positivo de inducción de IFN.

Un tercer grupo de 15 ratones se inoculó con una suspensión al 10 % de cerebro de ratón normal diluido en HLS.

Los animales se sacrificaron a distintos tiempos después de la inoculación por sección de los vasos axilares (de 3 a 5 ratones por punto) y la sangre se recogió en tubos siliconados, separando el suero con pipetas siliconadas. Este se conservó a −70° C hasta el momento de su titulación como IFN circulante.

Titulación de IFN

Se efectuó por adaptación de la microtécnica de Dahl y Degré [4] utilizando VSV como virus revelador, sobre células L.

El título se expresó como la mayor dilución que inhibe el 50 % de la acción citopática de 100 $DICT_{50}$ de VSV.

Resultados

Inducción de interferón in vivo: Los resultados de la inducción de interferón in vivo se presentan en la Figura 1. En los animales sacrificados a las 4, 7, 15, 24, 48 y 72 h post-infección (pi) se observa que el virus NDV induce en forma inmediata un título alto de interferón circulante, pues a las 4 h pi se encontró un máximo de 1 : 150, el que disminuyó rápidamente. En cambio el virus Tacaribe induce interferón en niveles más bajos y en forma más lenta. Se lo detecta a las 15 h pi en títulos de 1 : 10, llegando a un máximo de 1 : 20 a las 24 h. A las 48 h desciende ligeramente y se mantiene en el mismo nivel hasta las 72 h pi. El cerebro de ratón lactante normal no fue capaz de inducir niveles detectables de interferón sérico.

TABLA 1. — *Esquema de inducción de interferón in vitro*

Serie	Horas post-infección con Tacaribe (TAC) 0	24	48	72	96
A_1	TAC	(x) VSV	*		
A_2	TAC	——	(x) VSV	*	
A_3	TAC	——	——	(x) VSV	*
B	TAC	*	*	*	*
C_1	——	VSV	*		
C_2	——	——	VSV	*	
C_3	——	——	——	VSV	*
D	——	——	——	——	——

TAC: infección con 4 x 10^5 UFP; VSV: desafío con 100 $DICT_{50}$; (x): cosecha del sobrenadante para determinar interferón; *: cosecha del sobrenadante para determinar infectividad viral.

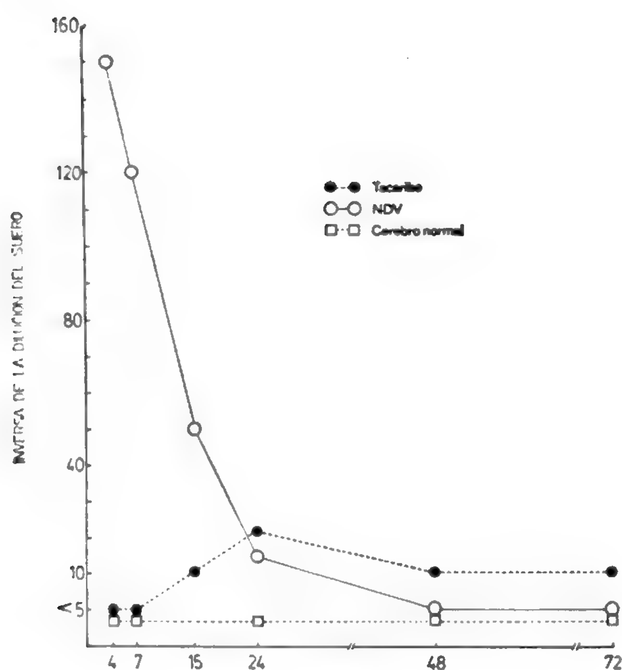


Fig. 1. — Actividad interferente frente a 100 $DICT_{50}$/ VSV de diluciones de sueros de ratones inoculados con cerebro de ratón normal, con NDV o con virus Tacaribe, extraídos a distintos tiempos después de la inoculación.

Inducción de interferón in vitro: El virus Tacaribe (serie B) replicó en las células CEP alcanzando a las 72 h pi un título máximo de 3.5×10^3 UFP/ml, titulado en RK 13. Esta baja multiplicación no fue acompañada de alteraciones celulares puesto que las monocapas observadas durante 10 días no mostraron diferencias con cultivos controles (serie D) mantenidos en forma paralela.

Los resultados obtenidos comparando la multiplicación del virus VSV en CEP (serie C) con la multiplicación del mismo virus en tejidos previamente infectados con virus Tacaribe (serie A) se presentan en la Tabla 2. La replicación del virus VSV desafiante en los cultivos previamente infectados con Tacaribe sufre una inhibición, que llega a un máximo de alrededor de 6.5 $\log_{10}$ a las 24 h, manteniéndose esta inhibición en 3 $\log_{10}$ aún a las 72 h.

TABLA 2. – *Replicación del virus VSV en cultivos de embrión de pollo previamente infectados con virus Tacaribe*

Horas	Rendimiento de VSV en cultivo *	
post-Tacaribe	Serie C	Serie A
24	1.6×10^8	5.0×10^1
48	4.6×10^7	5.0×10^2
72	5.0×10^6	6.0×10^3

* $DICT_{50}$/ml.

La actividad interferente de los sobrenadantes inducida por el virus Tacaribe en CEP se constata hasta la dilución 1 : 20 a las 48 h, para descender a 1 : 10 hacia las 72 h.

Discusión

Los resultados positivos de inducción de interferón por el virus Tacaribe obtenidos tanto in vivo (sistema ratón) como in vitro (sistema pollo), confirman los obtenidos por Luscri para el mismo virus en sistema mono y humano in vitro con distintos niveles de producción según el sistema empleado [8]. Se establece que los ratones utilizados son genéticamente aptos para responder a la inducción de interferón, por cuanto se obtienen altos títulos de interferón circulante con NDV, lo que permite establecer que los títulos moderados obtenidos con Tacaribe no dependen del huésped sino de la cepa viral utilizada. Por otra parte, experimentos previos han determinado que el virus Junin resulta sensible al interferón exógeno, habiéndose observado protección frente al efecto letal de bajas dosis de virus Junin en ratones lactantes infectados y tratados con interferón homólogo, en los que además se detectan niveles aumentados de interferón circulante al 8º día post-infección [1].

La progresión de muchas infecciones virales puede verse afectada tanto por la administración de interferón exógeno, como por su producción endógena [2], habiéndose registrado que en condiciones fisiológicas, la acción antiviral puede ser extremadamente rápida [6]. Por otra parte, se ha confirmado ampliamente que el interferón influye en la respuesta inmune a través de su interacción con las células implicadas en la respuesta humoral y celular [9].

El conjunto de observaciones expuestas, unido a nuestros resultados experimentales, nos inducen a postular que la protección temprana frente a virus Junin, observada por inmunización del cobayo con virus Tacaribe podría al menos parcialmen-

te, atribuirse al interferón. La importancia de la inmunidad celular en los mecanismos de la etapa temprana de la protección cruzada queda aún por investigar, pero seguramente tiene también un papel preponderante junto al interferón, como ya ha sido descripto en otros sistemas de protección heteróloga con Togavirus [17].

Resumen

La protección heteróloga contra virus Junin en cobayos infectados con virus Tacaribe se establece en forma rápida y es previa a la aparición de anticuerpos neutralizantes, por lo que se consideró que su origen se podría deber a fenómenos de interferencia viral entre los que el interferón inducido podría tener un papel preponderante. En este trabajo se evaluó la capacidad inductora de interferón del virus Tacaribe utilizando sistemas in vitro e in vivo. La inducción in vitro se realizó infectando las monocapas de cultivo de tejidos de embrión de pollo con virus Tacaribe y cosechando el sobrenadante a las 24, 48 y 72 h para determinar interferón. Inmediatamente las monocapas se desafiaron con virus de la estomatitis vesicular (VSV) y se tituló la replicación de este virus 24 h más tarde. Se encontró actividad interferente en el sobrenadante de los cultivos de embrión de pollo hasta la dilución 1/20 a las 48 h, descendiendo a 1/10 a las 72 h. Cuando se comparó la inhibición de la replicación del virus VSV en las células de embrión de pollo con la multiplicación del mismo virus en tejidos previamente infectados con Tacaribe, se observó una inhibición que llega a un máximo de 6.5 log a las 24 h, manteniéndose en 3 log aún a las 72 h. La inducción de interferón in vivo se evaluó en el suero de ratones adultos inoculados con 1.2×10^6 de virus Tacaribe por vía intravenosa. Como control se inoculó un grupo de ratones con 1.2×10^6 de virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y otro grupo con cerebro de ratón normal diluido. El virus Tacaribe induce interferón que aparece en el suero a las 15 h pi en títulos de 1/10 llegando a un máximo de 1/20 a las 24 h y descendiendo a las 72 h. En el suero de los ratones inoculados con cerebro de ratón normal no se detectó interferón; en cambio se observó un título de 1/150 a las 4 h pi en el suero de los ratones infectados con NDV el cual disminuyó rápidamente. Aunque en títulos muy bajos, se demostró en este trabajo que el virus Tacaribe induce interferón tanto in vitro como in vivo. Por experimentos anteriores sabemos que el virus Junin es sensible al interferón, lo cual nos permite sugerir que el mismo podría tener un papel importante en la protección temprana del virus Tacaribe contra el virus Junin.

Summary

INTERFERON INDUCTION BY TACARIBE VIRUS.

The heterologous protection against Junin virus, in guinea pigs infected with Tacaribe virus, is acquired within a few days prior to the appearance of neutralizing antibodies. Therefore, this protection was attributed to viral interference, in which the induced interferon could play a leading role. This paper evaluates the interferon inductive capacity of Tacaribe virus TRVL strain. Both in vitro experiments on primary chicken embryo cells (CEC), and in vivo work on adult mice, were carried out. The in vitro induction was performed by infecting CEC monolayers with Tacaribe virus and harvesting the supernatant at 24, 48 and 72 hours to detect interferon. The monolayers were at once challenged with Vesicular Stomatitis Virus (VSV) and their replication was titrated 24 hours later. Monolayers infected with Tacaribe virus alone, VSV alone, or without virus, were used as controls. The supernatants were kept for 5 days at pH 2.0, then dialyzed until neutral, and ultracentrifuged at 100 000 g for one hour. Interferon titers were assayed by the cytopathic effect protection method in L cells using 100 $TCID_{50}$ of VSV, as a challenge. The titers were expressed as the highest dilution at which 50 % cytopathic effect was inhibited. Interference capacity was found in the CEC supernatant up to 1/20 at 48 hours, dropping to 1/10 at 72 hours. When replication of VSV in CEC was compared with replication of the same virus in CEC previously infected with Tacaribe virus, it was observed that the VSV replication

system was greatly inhibited, reaching a maximum inhibition of 6.5 log at 24 hours and decreasing to 3.0 log at 72 hours. The in vivo interferon induction was evaluated by intravenous inoculation of adult mice with 1.2 × 10^6 $TCID_{50}$ of Tacaribe virus. As controls, mice were inoculated with the same dilution of normal mouse brain, or with 1.2 × 10^6 of NDV. Tacaribe virus induced a measurable level of serum interferon at 15 hours pi, reached the peak of 1/20 at 24 hours pi and decayed at 72 hours. Higher levels of interferon (1/150) were detected in NDV infected mice at 4 hours pi and rapidly decayed. However, interferon was not detected in mice inoculated with normal mouse brain. The present study clearly demonstrates that Tacaribe virus induces interferon even though it does so in low titers. Previous experiments showed that Junin virus is sensitive to interferon. These facts support the conjecture that the early protective effect of Tacaribe virus against Junin, in guinea pigs, is probably mediated by the induction of interferon. As for cellular immunity, its precise role in the early protection is still unknown, but there can be little doubt of its significance due to its importance in heterologous protection in other systems such as Togavirus.

Bibliografía

1. Ayerra de Holstein BL, Knecher LM, Teyssié AR: Interferón ratón en estudios de sensibilidad de virus Junin. VIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Resúmenes de Comunicaciones Libres, R 35, Oct 1979.
2. Baron S: The defensive and biological roles of the interferon system. Cap 13 en "Interferons and interferon inducers". NB Finter. Ed North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1973.
3. Coto C, Damonte EB, Calello MA, Weissenbacher M: Protection of guinea pigs inoculated with Tacaribe against lethal doses of Junin virus. *J Infect Dis* 141: 389, 1980.
4. Dahl H, Degré MA: Microassay for mouse and human interferon. *Acta Path Microbiol Scand*, section B, 80, 863, 1972.
5. Damonte EB, Coto CE, Calello MA, Weissenbacher M: Inmunización heteróloga contra virus Junin. Protección temprana. *Medicina (Bs Aires)* 38: 226, 1978.
6. Dianzani F, Baron S: Unexpectedly rapid action of human interferon in physiological conditions. *Nature* 257: 682, 1975.
7. Holstein BA de, Knecher LM, Teyssié AR: Inducción de interferón in vitro por virus Junin: efecto del pre-tratamiento con el inhibidor. *Rev Asoc Arg Microbiol* 9: 22, 1977.
8. Luscri BJ: Technical support for the assay of interferons. P 425-429 en Annual Progress Report, F.Y., 1976. U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases Fort Detrick, Md, 1976.
9. Maeyer E de, Maeyer-Guignard J de: Effect of interferon on cell mediated immunity. *Texas Rep Biol Med* 35: 370, 1977.
10. Merigan TC, Oldstone M, Welsh R: Interferon production during LCM infection of nude and normal mice. *Nature* 268: 67, 1977.
11. Parodi AS, Coto CE: Inmunización de cobayos contra el virus Junin por inoculación del virus Tacaribe. *Medicina (Bs Aires)* 25: 151, 1964.
12. Rivière Y, Bandu MT: Induction d'interferon par le virus LCM chez la souris. *Ann Microbiol Inst Pasteur* 128 A: 323, 1977.
13. Stephen E, Scott S, Eddy G, Levy H: Effect of interferon en Togavirus and Arenavirus infection in animals. *Texas Rep Biol Med* 35: 449, 1977.
14. Teyssié AR, Knecher LM, Holstein BA de: Interferón en la infección in vitro con virus Junin. *Medicina (Bs Aires)* 37 (Supl 3): 53, 1977.
15. Weissenbacher MC, Calello MA, Boxaca MC: Inducción de interferón y tratamiento con PIC en la infección in vivo e in vitro con virus Junin. *Rev Asoc Arg Microbiol* 8: 26, 1976.
16. Weissenbacher MC, Coto CE, Calello MA, Frigerio MJ, Damonte EB: Protección experimental contra virus Junin por inoculación del virus Tacaribe. *Medicina (Bs Aires)* 37 (Supl 3): 237, 1977.
17. Zuhair Latif, Gates D, Wust CJ, Brown A: Cross protection among Togaviruses in nude mice and littermates. *J Gen Virol* 45: 89, 1979.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 182-186 (1981)

EVALUACION DE UNA FRACCION ANTIGENICA ESPECIFICA DEL *TRYPANOSOMA CRUZI*

U. O. MARTIN, HURI G. FERNANDEZ, NORMA M. BOVERO, MARTA GHIGO, ELVIRA DAVILA, DIANA FABBRO

Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales Dr. R. Carrillo, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe

La composición antigénica del *Trypanosoma cruzi,* ha sido estudiada por muchos investigadores, a partir de la década del sesenta. El empleo de la Inmunoelectroforesis (IEF) permitió demostrar distintos sistemas antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) precipitantes, lo cual puso en evidencia la complejidad antigénica del parásito y la existencia de un constituyente de aparición más precoz y más constante en el curso de la infección experimental [1]. Cuando se correlacionó la IEF con la reacción de fijación del complemento, se demostraron diferencias en el número de arcos precipitantes en la fase aguda y crónica de la infección [2]. Finalmente, la IEF permitió la demostración fehaciente de una fracción antigénica específica, lo cual descubre una nueva perspectiva de investigación y probablemente de diagnóstico [3]. El objeto de este trabajo fue investigar la posibilidad de detectar el arco 5 antes mencionado en pacientes en diferentes estados evolutivos de la infección chagásica en comparación con población normal, correlacionándola con los resultados serológicos obtenidos para pacientes y no infectados. Con este fin se emplearon técnicas serológicas tituladas e IEF para estudiar sueros de pacientes infectados frente a antígenos del *T. cruzi.*

— — — —

Recibido: 18-II-1981. Aceptado: 11-III-1981.

Dirección postal: Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales Dr. R. Carrillo, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Pellegrini 2947, 3000 Santa Fe, Argentina.

Material y métodos

Se estudiaron un total de 100 sueros de pacientes, agrupados de la siguiente manera: 51 sueros de pacientes infectados crónicos, 23 sueros de pacientes con infección aguda, 11 sueros de individuos normales y 15 sueros obtenidos de sangre de cordón umbilical de recién nacidos, hijos de madres chagásicas crónicas. En estos últimos sueros no se encontró aumento de IgM total, el test de inmunofluorescencia para IgM específica fue negativo y los recién nacidos no presentaron signos de enfermedad congénita o connatal. La serología en estos sueros se negativizó en los primeros seis meses de vida y los exámenes parasitológicos en los niños fueron negativos [5]. El resto de las muestras fueron obtenidas por punción venosa, separado el suero y congelado a $-20°$ C, hasta el momento del estudio.

Con cada suero se efectuaron tres reacciones serológicas tituladas: inmunofluorescencia indirecta (IFI) [6], hemoaglutinación pasiva (HA) [6] y aglutinación directa (AD) con y sin tratamiento del suero con 2 mercaptoetanol (2ME) [4, 9].

El extracto antigénico soluble se preparó a partir de cultivos de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) en medio sumergido, empleando extractos de órganos, sales y suero bovino como fue descripto [8].

Los parásitos se colectaron por centrifugación a 1000 g durante 15 min, el sobrenadante se eliminó por aspiración y el sedimento fue lavado 4 veces con solución salina amortiguadora de Hanks. Luego los epimastigotes fueron suspendidos en una solución de ClNa (17 x 10^{-3} oml/l) a razón de 10 ml por 1 g de peso húmedo de flagelados. Esta

suspensión se congeló y almacenó a –20° C. La licuefacción total se obtuvo por congelación y descongelación, operación que fue repetida cuatro veces. Luego se centrifugó a 22 000 g a 4° C, durante 1 h. El sobrenadante fue dializado contra solución salina bufferada (SSB) (pH: 7.2) y concentrado con polietilenglicol.

Para el estudio de los sueros se utilizó inmunoelectroforesis en gel de agarosa. Este se preparó al 1 % en solución amortiguadora de veronal sódico pH: 8.2 (16 g de veronal sódico disueltos dentro de 400 ml de agua desionizada, más 22 ml de ácido clorhídrico 1 N, más agua desionizada csp 1 litro). Cuatro ml de agarosa fueron depositados por portaobjeto. El volumen de antígeno utilizado fue de 35 μl. Se utilizaron 23 volt/cm para la electroforesis efectuada en una corrida de 2 h. Se sembraron 200 ml de suero. El volumen de suero fue variado en las muestras negativas para el arco 5, en que se concentró el suero con polietilenglicol y así se lo ensayó nuevamente.

Luego de la electroforesis del extracto antigénico las placas se dejaron difundir por 7 días; el primer día a temperatura ambiente y el resto a 4° C. Las placas fueron lavadas con SSB y luego con agua destilada y coloreadas con negro amido 10B. La decoloración se efectuó con solución de ácido acético al 2 %.

Se hicieron observaciones diarias durante los 7 días de difusión y en la lectura final, posterior a la coloración, se analizó la intensidad del sistema arco 5 estableciéndose 4 categorías: ausencia, una cruz, dos cruces y tres cruces. Así también se registró el resto de los sistemas precipitantes.

De acuerdo a la técnica empleada y ya descripta, se realizó una división según la intensidad del arco 5, en cruces: con una cruz se incluyeron todos los sueros que presentaban una banda tenue pero definida y con tres cruces, los sueros que presentaban una intensa banda de precipitación. Con dos cruces, los sueros con una banda intermedia a los descriptos.

Resultados

1) *Infectados crónicos:* de los 51 sueros con serología positiva, 46 sueros presentaban arco 5, lo cual significa un 90.20 % y el resto 5 sueros, fueron negativos, aun con repetición del test variando cantidades y concentraciones del suero y del antígeno. De esos 46 positivos al arco 5, 29 sueros presentaban intensidad de una cruz (56.86 %), 13 sueros de dos cruces (25.49 %), y sólo 4 de tres cruces (17.65 %).

Considerando la reacción de AD y en base a nuestra experiencia serológica, de los 29 sueros con una cruz: 5 sueros (17.24 %) dieron títulos bajos (1/32; 1/64), 13 sueros (44.83 %) dieron títulos intermedios (1/128; 1/256; 1/512), y 11 sueros (37.93 %), dieron títulos altos (mayores de 1/512). Una situación similar se

Tabla 1. — *Frecuencia de aparición del arco 5, en relación con los grupos de sueros evaluados*

Sueros	Sueros c/arco 5/totales	%
Crónicos	46/51	90.20
Agudos	5/23	21.74
S. cordón	11/15	73.33
Normales	0/11	0.00

observó en los 13 sueros que presentaban dos cruces: 3 sueros (23.08 %) tenían títulos bajos, 6 sueros (46.15 %), títulos intermedios y 4 sueros (30.77 %), títulos altos. Mientras que de los cuatro sueros que presentaban tres cruces, todos tenían títulos altos (100 %) y ninguno tuvo un título menor de 1/1024, como fue habitual en los grupos con una y dos cruces. Es destacable que los 5 sueros que no dieron arco 5, ninguno tuvo un título mayor de 1/512 para la reacción de AD.

Considerando la reacción de IFI, en los grupos de una y dos cruces, predominan claramente los títulos intermedios; mientras que para el grupo de tres cruces (banda del arco 5 intensa), el 50 % de los sueros dieron títulos bajos. Los sueros que no presentaron arco 5 todos tuvieron títulos intermedios.

Con respecto a la reacción de HA, para los grupos de una, dos, tres cruces y ausencia de arco 5, predominaron claramente los títulos bajos.

2) *Infectados agudos:* se estudiaron 23 sueros de infectados agudos diagnosticados por hallazgos parasitológicos, clínicos y serológicos. Solamente 5 sueros presentaron arco 5 (21.74 %). De estos 5 sueros, dos presentaron una intensidad de una cruz, uno de dos cruces y dos de tres cruces. Es destacable que la reacción de HA dio negativa para la mayoría de estos sueros de infectados agudos.

3) *Sueros de cordón umbilical:* de los 15 sueros, 11 fueron positivos al arco 5 (73.33 %), mientras que el resto fue negativo (26.67 %).

Discusión

El *T. cruzi* al infectar al hombre despierta una respuesta inmunológica humo-

TABLA 2. — *Relación entre los títulos serológicos y la intensidad del arco 5, en pacientes chagásicos crónicos*

Sueros %	Títulos Intens. arco 5	1/32; 1/64 (bajos) %	1/128; 1/256; 1/512 (intermedios) %	Mayor de 1/512 (altos) %
29 (56.86)	una cruz	AD: 17.24 IFI: 25 HA: 54.17	44.53 53.57 37.50	37.93 21.43 8.33
13 (25.49)	dos cruces	AD: 23.08 IFI: 15.38 HA: 45.45	46.15 61.64 45.45	30.77 23.08 9.10
4 (17.65)	tres cruces	AD: 0.00 IFI: 50 HA: 75	0.00 25.00 25.00	100 25 0

ral, que atraviesa distintas etapas: una aguda, que corresponde con un aumento de IgM y una crónica, cuya inmunoglobulina más importante es la IgG. Esta reacción humoral, es detectada por distintas técnicas serológicas. En la actualidad se aconseja emplear por lo menos dos reacciones serológicas para descubrir un infectado chagásico. Mediante la IFI y la AD con el tratamiento del suero con y sin 2 ME, es posible discernir cuál de las dos inmunoglobulinas con actividad anticuerpo es más importante y de esta manera pensar en una infección aguda, crónica o en una reactivación. Por otra parte, Afchain y col. pusieron de manifiesto el arco 5, fracción remarcable, que en trabajos posteriores demostraron su especificidad; además por técnicas de microscopía electrónica, inmunofluorescencia y marcado con peroxidasas, se demostró que este componente es el mayor constituyente antigénico de la superficie celular y la membrana flagelar de las formas epimastigotes y tripomastigotes [7]. En este trabajo, hemos tratado de ver la importancia de la técnica como probable metodología diagnóstica, y qué relación existiría entre la presencia e intensidad del sistema Ag-Ac denominado arco 5, con los títulos serológicos del patrón de reacciones descriptas. En infectados crónicos parecería existir una correlación entre los títulos de la AD, con el empleo del 2 ME y la intensidad del arco 5. Esto estaría de acuerdo con la afirmación que el constituyente antigénico del arco 5 sería uno de los componentes más importantes de la membrana celular y flagelar [7], ya que la AD pone en evidencia casi exclusivamente anticuerpos contra estos constituyentes del parásito. Sin embargo, los resultados obtenidos en IFI no sugieren las mismas conclusiones. Mientras que la reacción de HA no presenta variaciones importantes con la intensidad del sistema arco 5, lo cual parecería demostrar no tener ninguna relación.

Fue posible evidenciar, además, la alta frecuencia del componente 5 en los infectados crónicos (90.20 %), mientras que aparece en mucho menor proporción en infectados agudos (21.74 %). Estos resultados difieren en el porcentaje de agudos con arco 5 positivo encontrados por Afchain y col. usando como reacción serológica la fijación de complemento [2]. Nosotros pensamos que nuestro patrón de reacciones permite una positivización más precoz, no pudiendo detectarse aún presencia del sistema arco 5. En virtud de esto, estudiamos un modelo natural donde los sueros con anticuerpos anti-*T. cruzi* corresponden exclusivamente a IgG. Estos sueros son de recién nacidos de madres chagásicas crónicas. En ellos se practicaron, además, dosajes de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) e investigación de haptoglobina, para descartar fugas placentarias en el parto. Este ensayo demostró una frecuente aparición del arco 5 (73.33 %), lo cual puede hacernos pensar que la IgG tiene mayor afinidad que la IgM para precipitar el componente antigénico del arco 5, o bien que en los infectados agu-

dos con clara sintomatología clínica, no pasó suficiente tiempo como para que el componente antigénico del arco 5 despierte una respuesta inmunológica específica. Es de destacar que los títulos serológicos de las reacciones de AD con y sin tratamiento con 2 ME y el test de IFI para IgM específica, revelaron presencia de IgM anti-*T. cruzi*, en el 100 % de los sueros de infectados agudos en que fueron aplicados.

Este estudio demostró, además, que existen varios sistemas Ag-Ac en el suero de infectados chagásicos, aparte del sistema arco 5 y que son demostrables. Es así que tres de los cinco sueros de infectados crónicos negativos para el arco 5, presentan otros sistemas Ag-Ac precipitantes; mientras que en tres de los cuatro sueros de recién nacidos negativos al arco 5, también presentan uno o más sistemas precipitantes. En los 11 sueros con serología negativa (población normal), el número de sistemas precipitantes fue nulo. Por todo esto, es necesario pensar en la existencia de otros sistemas específicos para el *T. cruzi* que podrían demostrarse o que los sueros negativos al arco 5 podrían corresponder a infecciones por otro agente infectante.

Nosotros pensamos que la utilidad de la IEF en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, se observaría exclusivamente en los infectados crónicos. No sucedería lo mismo con los infectados agudos, donde el porcentaje de positividad del arco 5 es bajo. Aun así, la IEF no podría superar a la serología que empleamos en el diagnóstico, en ningún caso, en virtud de la rapidez y sencillez de la obtención de los resultados, hecho éste de relevancia, sobre todo en los bancos de sangre y urgencias del diagnóstico. Sí entendemos que es muy importante investigar el arco 5 con IEF para diferenciar infección *T. cruzi* y otros parásitos, ya que es sabido que las entidades antigénicas pueden ser similares. Por otro lado, la aparición, por IEF, de distintos sistemas Ag-Ac en sueros donde no se pudo demostrar el arco 5, hace pensar que podrían existir otros inmunógenos que podrían ser también específicos para el *T. cruzi*. Un mayor conocimiento de estos temas aportarían más claridad a la particular relación entre el huésped y el *T. cruzi*.

Resumen

Distintos autores postularon una fracción antigénica específica para el T. cruzi, *que aparentemente fue encontrada en la superficie celular y membrana flagelar del* T. cruzi. *Nosotros hemos querido semicuantificar esta fracción, puesta de manifiesto por inmunoelectroforesis (arco 5) y relacionarla con nuestro patrón serológico. Las distintas reacciones que lo comprenden, utilizan distintas fracciones antigénicas y tienen distintos principios biológicos. De esta manera, parecería existir una asociación entre la cantidad de arco 5 y títulos altos en los sueros por reacción de aglutinación directa. No sucedió lo mismo con inmunofluorescencia indirecta, ni en hemoaglutinación pasiva. El estudio permitió observar distintos sistemas antígeno-anticuerpo cuando se enfrentan sueros de infectados chagásicos y extractos solubles de* T. cruzi. *Estos aparecen cualitativa y cuantitativamente en forma diferente en las placas de inmunoprecipitación en los estados crónicos y agudos de la infección. En sueros de infectados en que el arco 5 no se observa, se postula que podrían existir otros sistemas antígeno-anticuerpos específicos para el* T. cruzi. *Se hace una evaluación de la técnica como posible metodología diagnóstica y su aplicación más importante.*

Summary

EVALUATION OF A SPECIFIC ANTIGENIC FRACTION FOR *T. cruzi.*

Different authors have postulated a specific antigenic fraction for T. cruzi *found on the cellular surface and flagellar membrane of* T. cruzi. *We attempted a semiquantification of this fraction which appears in immunoelectrophoresis as Nº 5 bow and we tried to relate it with our serologic pattern. There seems to be an association between Nº 5 bow quantity and the high serum titres as determined by*

direct agglutination. No relationship was observed either with indirect immunofluorescence or passive hemagglutination. This confirms the suggestion that this fraction could be found in high proportion on the cellular surface of flagellar membrane. It is possible to observe, by means of this study, different antibody-antigen systems when human infected sera are incubated with soluble extracts of T. cruzi. *They appear, quantitatively and qualitatively, in a different way in the immunoprecipitation plaques in the chronic or acute conditions of the infections. An evaluation of these techniques is made proposing them as a possible diagnostic methodology. This study shows that the the usefulness of the IEF in the diagnosis of Chagas disease is exclusively for the chronic patient and not for the acute state where the positivity is low (Table 1). Even so, the IEF could not replace the serology employed for diagnosis, because of its simplicity and rapid attainment of the results. Furthermore, it is very important to investigate Nº 5 bow for IEF in areas where other infections co-exist in patients where different antigenic entities could be encountered.*

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Dra. Amalia de Marteleur del Centro de Chagas y Patología Regional, Santiago del Estero, República Argentina, los sueros de infectados agudos. Esta investigación fue parcialmente financiada con subsidios distribuidos por el CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina), pertenecientes al Programa de Investigación sobre la Enfermedad de Chagas de la Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología.

Bibliografía

1. Afchain D, Capron A: Etude préliminaire des antigènes solubles de *T. cruzi*. *C R Acad Sc Paris* 269: 272, 1969.
2. Afchain D, Capron A: Les anticorps precipitants dans la trypanosomiase américaine humaine. *Gaz Méd Bahia* 3: 141, 1970.
3. Afchain D, Le Ray D, Fruit J, Capron A: Antigenic make-up of *T. cruzi* culture forms. Identification of a specific component. *J Parasitology* 65: 507, 1979.
4. Allain DS, Kagan IG: An evaluation of the direct agglutination test for Chagas' disease. *J Parasitology* 60: 179, 1976.
5. Bovero N, Beltramino R, Streiger E, Dávila M, Martín U: La enfermedad de Chagas congénita. *Medicina (Bs Aires)* 40 (Supl 1): 239, 1980.
6. Cerisola JA: Immunodiagnosis of Chagas' disease hemagglutination and immunofluorescence tests. *J Parasitology* 56: 409, 1970.
7. Fruit J, Afchain D, Petitprez A, Capron A: *T. cruzi:* Localization of a specific component on the surface of bloodstream Trypomastigote and culture epimastigote forms. *Exp Parasit* 45: 183, 1978.
8. Miglietta HF, Marzocchi VA, Martínez RA, Barrios MA: Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* en medio monofásico. Efecto de la concentración de glucosa en el desarrollo celular. *Medicina (Bs Aires)* 40 (Supl 1): 254, 1980.
9. Schmuñis GA, Szarfman A, Vattuone NH: Directed agglutination test in the detection of anti-*T. cruzi* antiboides in mice. *J Parasitology* 58: 1006, 1972.

It is now, as it was then, as it may ever be, conceptions from the past blind us to facts which almost slap us in the face.

Ocurre que ahora, como antes, y como será siempre, los conceptos del pasado nos ciegan frente a hechos que casi saltan a la vista.

W. A. Halsted,
1908

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 187-200 (1981)

RETROSPECTIVE EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF HEMOPOIETIC SYSTEM NEOPLASMS IN ARGENTINA

E. QUIROGA MICHEO, E. J. CALCAGNO, SUSANA I. CALABRIA, S. C. BESUSCHIO, J. H. MAGNASCO, F. SACKMANN MURIEL, E. MACCIONE, C. BARROS, A. SANTORO, ZULMA C. DE SOTO

Grupo Argentino Cooperativo de Estudios Epidemiológicos en Hematología (GACEEH), Buenos Aires

Research developments in hemopoietic system neoplasms have stimulated epidemiologic inquiries in an attempt to find a clue to the possible etiology of these diseases. Radiation, chemical agents and heredity are among the factors supposedly related to the cause of leukemia or lymphoma cases. An investigation designed to estimate the incidence of these and other factors has been going on for some time, and the preliminary results have already been reported [49-55]. These studies have shown the following principal findings: 1) Lower rates of leukemias among Spaniards than in Italians ($p = 0.001$). 2) More frequent contact with animals, specially dogs. 3) A greater exposure to petroleum and its by-products, such as insecticides. These and other observations led us to continue these studies. In this paper, the results of a case-control study carried out on 603 pairs from 16 medical centers in Argentina are presented.

— — — —

Received: 17-IX-1980. Accepted: 11-III-1981.

* Presented at the 18th Congress of the International Society of Hematology, Montreal, Canada, August 1980.

Postal address: Grupo Argentino Cooperativo de Estudios Epidemiológicos en Hematología (GACEEH), Las Heras 1895, 1127 Buenos Aires, Argentina.

— — — —

This study was conducted in the following Institutes by the investigators mentioned below:

1) Policlínico Ferroviario Central: E. Quiroga Micheo, E. J. Calcagno, S. I. Calabria.
2) Instituto de Investigaciones Hematológicas: S. C. Besuschio, G. F. Garay, S. Pavlovsky.
3) Instituto Municipal de Hematología: J. H. Magnasco.
4) Hospital de Niños: J. A. Peñalver, F. Sackmann Muriel.
5) Instituto de Oncología A. H. Roffo: E. A. Accame, E. Maccione.
6) Hospital de Clínicas José de San Martín: C. Barros.
7) Hospital de Pediatría Pedro de Elizalde: S. R. de Sijvarger. †
8) Instituto Municipal de Oncología: A. Santoro.
9) 5ª Cátedra de Medicina: E. Quiroga Micheo.
10) Hospital Italiano: A. Precerutti.
11) 1ª Cátedra de Pediatría: E. Bugnard, R. Kvicala.
12) Instituto Modelo de Clínica Médica Luis Agote: A. Macchi. †
13) Hospital Salaberry: S. D. de Rudoy.
14) Policlínico Ferroviario de Mendoza: J. Sanguedolce.
15) Hospital Nacional Ramón Carrillo: S. I. Calabria.
16) Cátedra de Radiología y Radioterapia: C. Cusien.

Volunteer inquirers: Z. C. de Soto (LALCEC) and E. Gil (Policlínico Ferroviario Central).

— — — —

† Deceased in 1980.

Material and methods

The data recorded were obtained from 603 patients with hemopoietic system neoplasms (HSN) and 603 controls coming from 16 medical centers, whose diagnosis were made between 1973 and 1980 using similar diagnostic criteria. In some diseases there were not enough patients to allow a comparison. For this reason, the study was carried out on HSN as a whole and in 5 subclasses: acute lymphocytic leukemia (ALL), including 2 acute undifferentiated leukemias in patients under 15 years old: 153 pairs; acute non-lymphocytic leukemia (ANLL), including 14 undifferentiated leukemias in patients over 15 years old: 70 pairs; myeloproliferative disorders (MD), including 37 chronic myelocytic leukemias, 10 polycythemia vera and 4 agnogenic myeloid metaplasias: 51 pairs; lymphoproliferative disorders (LD), including 51 chronic lymphocytic leukemias, 110 non-Hodgkin lymphomas and 35 multiple myelomas: 196 pairs; and Hodgkin's disease (HD): 133 pairs. The control group consisted of non-neoplastic patients of the same sex and age group (5-year periods) from the same hospitals. Using a prepared questionnaire, field investigators obtained information concerning anthropological, familial, prenatal, environmental, personal and socioeconomical factors. All the patients or their parents, if they were children, were personally interviewed by the inquirers.

Some of the questions, such as the nationality of origin, religion, somatic anthropological characteristics, interpersonal contact with cancer patients, anticonvulsants and socioeconomical factors, were added during the study and therefore were only answered by 432 pairs.

Other questions, concerning unrelated factors such as syphilis, allergy, brucellosis and platanaceae were included for the purpose of evaluating the work of the field investigators: in these, no differences were observed. Some results are expressed in terms of the percentage of respondents to each question. The number of people that did not respond was similar in both groups.

To find the nationality of origin, the place of birth of both parents and grandparents was asked for. On the basis of the answers, percentages of the origin of each patients were determined.

For the comparison of blood groups, the control group was estimated on the basis of the expected frequency for a similar hypothetical population according to the place of birth[57]. This technique was used in an effort to eliminate the differences that can be attributed to the different places of birth observed in each group.

With respect to familial antecedents, the patients were questioned about the following relatives: parents, grandparents, children, grandchildren and siblings, and spouses. The data sought for the living relatives were age and state of health; for the dead, age and cause of death. The results were adjusted for sex and age. Those relatives about whom information was incomplete were not considered.

For the socioeconomical stratification, the following data were used: highest educational level reached, profession, home characteristics, and kind of income (wages, profits, etc.).

Statistical tools. The significance of the observed differences was determined calculating the value of z using the following formula[6]:

$$z = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{\frac{PQ}{n_1} + \frac{PQ}{n_2}}}$$

P_1: proportion of the factor in the case group.
P_2: proportion of the factor in the control group.
P: proportion of the factor in both groups.
Q: proportion of absence of the factor in both groups.
n_1: number of cases.
n_2: number of controls .

The value of p (probability) has been estimated using the table of the cumulative normal distribution[14]. This statistical tool was preferred to the one used by Mantel and Haenszel[39] because it brought out less significant differences thus giving them more validity. For instance, when the difference observed in the incidence of black eyes in the LD subclass pairs was analyzed with the former formula, p was 0.06 and with Mantel-Haenszel method, p was 0.05.

The relative risk was estimated using the following formula[39]:

$$R = \frac{A\,D}{B\,C}$$

R: relative risk; A: cases with the factor; B: cases without the factor; C: controls with the factor; D: controls without the factor.

The Mantel and Haenszel method was used when it was necessary to discard a spurious association[39].

Results

Anthropological factors: The following anthropological factors have been investigated: place of birth, nationality of origin, religion, colour of skin, thickness, colour and waviness of hair, colour of eyes and blood groups (ABO and Rh).

Concerning the place of birth some differences were observed (Table 1). When considering HSN as a whole, there were more people in the case group born in the Province of Buenos Aires ($p = 0.008$). This difference was mainly observed in ALL. In ALL subclass, however, there were fewer cases born in Buenos Aires

TABLE 1. — *Place of birth*

Place of birth	Subclasses	Cases	Controls	p	R
Buenos Aires city and surroundings [a]	ALL	53.94 [f]	71.24	0.02	—
The rest of the Province of Buenos Aires [a]	ALL	19.60	10.46	0.02	—
North-western region	LD	1.53	3.61	0.04	0.27
Italy [b]	ANLL	7.24	0	0.02	—
Italy [c]	HD	3.78	0	0.02	—
Spain and Portugal [d]	ANLL	0	5.80	0.04	—
Spain and Portugal [e]	HD	0	3.05	0.04	—
Spain and Portugal	LD	8.16	2.58	0.01	3.17

a These differences are imputable to a higher migration of HSN patients; b Presumptively R more than 5; c Presumptively R more than 5; d Presumptively R less than 0.25; e Presumptively R less than 0.25; f Percentage of respondents.

city and its surroundings. These results are imputable to a higher migration of HSN patients to the best equipped centers of Buenos Aires city. In HSN pairs, mainly in LD subclass, fewer cases were born in the Northwest of the country ($p = 0.01$ and $p = 0.04$). This can not be attributed to a migration of patients.

Other differences were found: in ANLL and HD pairs there were more cases born in Italy than controls ($p = 0.02$ and $p = 0.02$). Considering people born in Spain and Portugal, there were fewer cases in ANLL and HD subclasses ($p = 0.04$ and $p = 0.04$) and more cases in LD ($p = 0.01$).

The following differences were observed when the nationalities of origin were analyzed (Table 2). Among the ancestors of the ANLL and HD cases, there were fewer Spaniards and Portuguese ($p = 0.01$ and $p = 0.04$) than in the controls, and fewer cases were observed in the LD pairs, whose ancestors were Paraguayans, Chileans or Bolivians ($p = 0.04$). No differences were observed with regard to the religion and blood groups.

Concerning somatic characteristics only differences in the colour of eyes were observed (Table 3). In ALL and ANLL pairs, there were fewer cases with green eyes ($p = 0.05$ and $p = 0.01$) and in the ANLL subclass there were also fewer cases with blue or grey eyes ($p = 0.04$).

Familial factors: These results were based on the analysis of 4718 relatives and 331 spouses of the patients and 4249 relatives and 272 spouses of the controls. No differences were observed when crude and proportional mortalities caused by cancer or HSN in the relatives and spouses were considered; relatives, proportional mortality by cancer: cases 22.91, controls 22.91; proportional mortality by HSN: cases 1.18, controls 1.13. LD was the only subclass in which an excess of

TABLE 2. — *Nationality of origin*

Subclasses	Italy		Spain or Portugal		Europe: East and Center		Bolivia, Chile or Paraguay	
	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases	Controls
ALL	9.11 [e]	11.13	4.96	8.82	1.69	1.90	4.23	2.74
ANLL [a]	31.08	13.51	**5.40**	**27.70**	4.79	6.80	3.42	6.12
MD	30.47	17.71	13.04	20.83	4.50	0	2.27	1.04
LD [b]	34.12	35.11	20.80	17.28	12.96	8.30	**0.73**	**4.98**
HD [c]	21.23	13.46	**9.14**	**20.05**	11.38	5.26	5.42	4.98
HSN [d]	23.96	20.27	**11.76**	**16.65**	8.38	5.12	3.14	4.51

a Spain or Portugal: $p = 0.01$; $R = 0.19$; b Bolivia, Chile or Paraguay: $p = 0.04$; $R = 0.15$; c Spain or Portugal: $p = 0.04$; $R = 0.46$; d Spain or Portugal: $p = 0.05$; $R = 0.71$; e Percentage of respondents.

TABLE 3. — *Colour of eyes*

Subclasses	Green eyes		Blue and grey eyes	
	Cases	Controls	Cases	Controls
ALL [a]	**7.08** [d]	**15.38**	5.31	5.13
ANLL [b]	**2.78**	**21.62**	**0**	**10.81**
MD	8.33	20.33	8.33	4.16
LD	12.59	16.41	13.33	13.43
HD	10.99	7.69	9.89	6.59
HSN [c]	**9.52**	**14.89**	8.77	8.68

a Green eyes: p = 0.05; R = 0.46; **b** Green eyes: p = 0.01; R = 0.13; Blue and grey eyes: p = 0.04; Presumptively R less than 0.25; **c** Green eyes: p = 0.02; R = 0.64; **d** Percentaje of respondents.

HSN among relatives was observed, but the difference was not statistically significant. The same was found in the spouses.

Prenatal factors: The following prenatal factors were investigated: age of the mother at birth, birth order, number of radiographs made before or during pregnancy (abdominal and others), history of stillborn siblings, history of mother's spontaneous miscarriages and viral infections during pregnancy. Differences were only observed in the first two factors (Table 4). In the HSN pairs, fewer cases were born from young mothers ($p = 0.0002$). These differences were observed in patients under 20 years old ($p = 0.01$) and probably in older patients. When each subclass was considered, the difference was significant in ANLL ($p = 0.007$) and in ALL ($p = 0.02$). With regard to the birth order, in the HSN pairs, fewer cases were first born and more cases were born in second, third, etc., order ($p = 0.00002$). The differences were observed both in children ($p = 0.003$) and in adults ($p = 0.00002$), mainly in ALL ($p = 0.003$), LD ($p = 0.00002$) and HD ($p = 0.04$). In cases and controls the prenatal findings were not imputable to the differences due to the place of birth. The correction made by the Mandel and Haenszel method yields the following: age of patient's mother at birth, $p = 0.002$; birth order, $p < 0.001$.

Environmental factors: The following environmental factors were studied: place of residence, occupation, interpersonal contact with cancer patients, habitual exposure to pinaceae, platanaceae, industrial chemicals and insecticides, habitual contact or co-habitation with animals and wounds made by dogs and cats.

Regarding the province of residence, either urban or rural residence, some differences are imputable, at least partially, to a greater migration of patients with HSN to the medical centers of Buenos Aires city. The only result not attributable to that fact is observed in the Northwest where there were fewer cases of HSN than controls ($p = 0.03$), mainly due to

TABLE 4. — *Prenatal factors*

HNS investigated	Percentage of mothers under 30 years old			Percentaje of firstborns		
	Cases	Controls	p	Cases	Controls	p
All HSN [a]	64.86	76.94	0.0002	33.87	51.58	0.00002
HSN under 20 years old	63.68	79.10	0.001	41.09	55.94	0.003
HSN over 20 years old	65.92	74.42	no sign.	28.91	48.35	0.00002
HSN born in Buenos Aires city and surroundings	67.35	78.10	0.015	36.44	57.36	0.00002
HSN born in the rest of Argentina	63.59	74.26	0.04	29.05	44.72	0.002
ALL	66.44	78.08	0.025	42.67	59.86	0.003
ANLL	64.15	87.50	0.007	35.59	52.72	no sign.
MD	66.67	100.00	no sign.	37.50	45.24	no sign.
LD	61.70	74.32	no sign.	31.20	58.77	0.00002
HD	63.27	67.44	no sign.	23.77	35.89	0.04

a Corrected by place o birth: mothers under 30 years old: p = 0.02; R = 0.41, firstborns: p < 0.001, R = 0.44.

TABLE 5. — *Place of residence. Hemopoietic system neoplasm pairs (HSN)*

Place of residence	Cases	Controls
Buenos Aires and surroundings	412	479 [a]
The rest of the Province of Buenos Aires	92	58 [b]
Littoral	39	27
Central region	25	13 [c]
North-western region	2	9 [d]
Andean region	8	9
Patagonia	9	6
North-western region (lymproproliferative disorders	0	4 [e]
Rural residence	38	15 [f]
Rural residence (Acute lymphocytic leukemia)	12	3 [g]

a p = 0.0002; b p = 0.003; c p = 0.05; d p = 0.03, R = 0.22; e p = 0.05 R presumptively less than 0.25; f p = 0.002; g p = 0.002; a, b, c, f, g, may be attributed at least partially to a greater migration of HSN patients to Buenos Aires city.

differences in the LD subclass (Table 5). No differences were observed with regard to the interpersonal contact with cancer or HSN patients.

The occupations of the patients were only compared with regard to exposure to some environmental factors, such as constant exposure to petroleum and its by-products, benzol, other chemicals, animals, and health workers. Differences were observed only in the former. In the HSN pairs ($p = 0.03$, $R = 1.68$) and mainly in the ANLL subclass ($p = 0.01$) there were more cases whose occupations exposed them to petroleum: drivers, machinists, mechanics, etc.

When HSN pairs were asked about habitual exposure to chemical factors, fewer cases denied any exposure ($p < 0.00002$), and more cases stated they were habitualy exposed to petroleum and its by-products ($p < 0.00001$). These observations were mainly made among people living in Buenos Aires city and its surroundings and were less evident among residents of the rest the rest of Argentina. Furthermore, when considering urban or rural sites, the difference was only observed i nthe former (Table 6). When each subclass was studied separately, the difference was mainly observed in MD ($p = 0.02$), LD ($p = 0.006$) and HD ($p = 0.005$).

With respect to exposure to insecticides, more cases stated they had contact with these factors. The difference was bigger in subjects living in Buenos Aires and its surroundings and in urban sites and was not observed in patients coming from the rest of Argentina and from rural sites. ALL was the subclass in which the difference was mainly observed ($p = 0.02$).

Concerning habitual exposure to trees, it was found that more HSN cases were exposed to pinaceae. The difference was not significant when the correction was made for province of residence and urban and rural types of residence.

In the HSN pairs, a greater number of cases had a history of contact or cohabitation with dogs or other animals. When cohabitation with animals was analyzed excluding some possible spurious association with residence, significant differences

TABLE 6. — *Habitual exposure to petroleum and its by-products*

Diagnosis [a]	Residence	Cases	Controls	p	R
HSN	Argentina	15.03 [c]	6.26	0.00001	2.56
HSN	Capital [b]	14.77	5.31	0.00001	3.12
HSN	Rest of Argentina	15.61	10.17	no sign.	—
HSN [c]	Urban	15.51	6.33	0.00001	2.62
HSN	Rural	8.11	6.66	no sign.	—
ALL	Argentina	6.00	2.00	no sign.	—
ANLL	Argentina	11.76	5.88	no sign.	—
MD	Argentina	16.00	2.04	0.02	7.84
LD	Argentina	19.07	9.33	0.006	2.04
HD	Argentina	20.93	8.40	0.005	2.49

a Corrected by place of residence (B.A. and interior) and/or urban and rural type of residence; b Buenos Aires city and its surroundings; c Percentage of respondents.

TABLE 7. — *Co-habitation with animals*

Animal	Diagnosis	Residence	Cases	Controls	p	R
Dogs	HSN [a]	Argentina	29.56 [c]	23.73	0.05	1.30
Dogs	HSN	B.A. [b]	30.94	21.23	0.001	1.65
Dogs	ALL	B.A. [b]	29.90	16.16	0.02	1.84
Dogs	HD	B.A. [b]	40.23	25.51	0.03	1.58
Cats	HSN [a]	Argentina	10.47	8.64	—	—
Cats	ALL	B.A. [b]	12.37	1.63	0.001	7.60
Birds	HSN [a]	Argentina	4.56	2.71	—	—
Birds	HSN	B.A. [b]	5.28	2.55	0.05	2.15
Birds	LD	B.A. [b]	6.80	1.94	0.04	3.51

a Corrected by place of residence (B.A. and rest of Argentina) and by urban and rural sites; b Buenos Aires city and its surroundings; c Percentage of respondents.

were observed for dogs and birds. When patients coming from Buenos Aires and its surroundings were considered separately, it was found that the difference was greater than that observed in subjects living in the rest of Argentina. In the ALL pairs there were more cases who had cohabited with dogs and cats (Table 7), in the HD with dogs and in the LD with birds. More HSN cases stated having been wounded by dogs and cats but differences were not significant.

Personal factors: The following personal factors were considered: mongolism, congenital abnormalities, simian fold, Sydney fold, thymoma, neoplasms, allergy, tonsillectomy, appendectomy, tuberculosis, syphilis, brucellosis, leprosy, BCG, chloramphenicol, phenylbutazone, anticonvulsants, chemotherapy, number of radiographs, radioscopes, radiotherapy and radioisotopes. In addition, in children, viral infections and vaccinations were investigated.

Differences were only found with regard to the presence of simian and Sydney folds ($p = 0.02$ and $p = 0.006$). The ALL subclass was the only one in which the differences were significant. Sydney fold: cases 4.73 %, controls 0.65 % ($p = 0.03$); simian fold: cases 2.02 %, controls 0; cases with both folds 6.75 %, controls 0.65 % ($p = 0.005$).

Socioeconomical factors: Socioeconomical distribution was similar in both groups.

Discussion

Case-control study in health epidemiology

The retrospective analytic type of epidemiological investigation (case control) requires less extensive data collection than the cohort approach (prospective study). In illnesses in which incidence is low, prospective studies are difficult and expensive and tend to be laborious since several thousands of people have to be studied with regard to exposure and outcome of disease, or death. It is possible with the case-control method to study the etiological influence of several factors and to determine relative risk and absolute mortality and morbidity rates [2]. However, there are many methodological pitfalls which can be a source of bias in a case —referent study. For this reason, we paid special attention to the method of patient selection. In the case group, all the available HSN patients were included. The choice of controls presented some problems. For each HSN patient, the first available non-neoplastic patient from the same hospital of the same sex and age group was chosen. These controls were selected among the patients of the same hospital in order to retain a similar diagnostic approach, a similar pre-hospital surveillance and mainly the same residence, and demographic and clinical susceptibility for both groups. Hospital population was preferred knowing that ill referents

might be more willing and even eager to reply, than healthy individuals who might find little or no interest in answering these questions. It was considered necessary to discard neoplastic patients because of the possibility that some common factor connected with both cancer and HSN patients could remain unobserved. For similar reasons, an illness of equal incidence and prognosis was not selected; furthermore, if some factor is lacking in the other disease, this factor can be over estimated. Moreover, it is very difficult to obtain controls of the same sex and age. Controls with a wide variety of diseases should be preferred [2, 39]. The choice of a general hospital population as controls introduced a bias that was expected. In fact, the bad prognosis of the HSN caused a higher migration of these patients to the better equipped hospitals of Buenos Aires. This migration was more significant among patients living near Buenos Aires. As the investigation of anthropological and environmental factors is one of the research goals, the choice of controls from similar places of residence was not done in order to avoid some unobserved or over observed factor. But the differences found in the place of residence can introduce some bias. We think that this bias can be corrected in two ways: 1) Adding other controls with a similar place of residence; this correction is difficult and prolongs the investigation; 2) Using Mantel and Haenszel method when significant differences in the incidence of some factor were observed [39].

In retrospective studies it is desirable to use blinded interviewers. This was not possible in this study. In order to evaluate the work of the investigators, some questions about nonrelated factors were introduced. In these questions no differences were observed. Another way of evaluating the investigators is by comparing the amount of non-respondents which are similar in both groups. When interviews are made to assess exposure, the situation may get problematic. As the questions cover various matters in addition to the exposure under consideration, cases and controls may tend to answer in a similar manner. However, we consider that there is some inaccuracy in the information about exposure. For this reason we give more validity to the results obtained from concrete questions: therefore, the results observed in patients living with animals were more significant than those concerning the exposure to animals; in the same way, jobs connected with petroleum have more validity than exposure to this factor.

Horwitz and Feinstein [23] have pointed out 11 methodological standards that would enhance the scientific quality of case control research: 1) predetermined method, 2) specification of the agent, 3) unbiased data collection, 4) anamnestic equivalence, 5) avoidance of constrained cases, 6) avoidance of constrained controls, 7) equal diagnostic examination, 8) equal demographic susceptibility, 9) equal diagnostic surveillance, 10) equal clinical susceptibility and 11) avoidance of protopathic bias. In our work, only two of these standards were not entirely fulfilled. One was "unbiased data collection". We have mentioned that blinded interviewers were not used, but the same person interviewed both the case and his corresponding control and the precautions that were taken to correct possible pitfalls have been described. The other was "amnanestic equivalence" which can only be violated with regard to exposure to some factors, but we have already said that these results have less validity.

With regard to the familial factors the case control studies were criticized because proper account of familial antecedents had not been taken into account in the control groups. In this study all direct relatives were investigated and only those who have reported complete information were considered. We think that the comparison of the proportional mortality with this approach minimized underreporting. The control group of the study of familial factors can be a matched series of patients without HSN or healthy people. Other investigators used population statistics. We preferred a matched series because the use of population statistics was not appropiate due to the different places of residence of the cases and the different dates of death of the relatives. The problem of the "index case" was solved eli-

minating the HNS relative of the second diagnosed proband, when two cases belonged to the same family. It is a similar method to the one advised by Greenwood and Yule [25] which was not used because in many families the relatives with HSN were not probands.

Anthropological factors

In descriptive epidemiological studies made in Argentina differences were found in the mortality caused by HSN according to nationality [49-55]. So, in these reports lower rates of leukemia among Spaniards than among Italians ($p = 0.00001$) and high rates among Turks, Syrians and Lebanese were observed. The analysis of rates recorded in several European countries shows that Spain suffers one of the lowest mortality rates caused by these diseases [44, 45]. Moreover, in 1956, a lower frequency of Spaniards with leukemias in the Galician Medical Center of Buenos Aires, specially among the Galicians, an ethnic group of Celtic origin, was reported [33]. Other ethnic differences were reported. It was observed that Latin American children [35] and Jews [37] have a high incidence of leukemia, that Italians have a high incidence of Hodgkin's disease [40] that Mexican mestizos have a low incidence of chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma [61] and that blacks have a high incidence of multiple myeloma [9] with more favorable survival capacity than white patients [4]. The incidence of chronic lymphocytic leukemia and lymphosarcoma is very low among the Japanese [26]. Some of these reports were confirmed in this study. When the place of birth was compared, few Spaniards were observed in the ANLL subclass, and many Italians in the HD subclass. The same was observed when the nationality of origin was compared; nevertheless the difference observed in Italians was not significant.

The differences observed in the colour of the eyes were in relation to the preceding findings. In the ANLL subclass there are fewer cases with blue and green eyes. The European immigration in Argentina came mainly from the North of Spain and the South of Italy. The former have a higher frequency of blue and green eyes. Other ethnic differences were also observed. In the LD subclass there are fewer cases born in the Northwest of Argentina and fewer cases whose ancestors came from Chile, Paraguay and Bolivia. Following this observation, it is possible that Latin Americans of aborigine origin have a low incidence of LD. Ethnic differences can be produced by environmental or genetic factors. The differences observed in Argentina should be attributed to genetic factors since Spaniards and Italians have a similar geographical distribution and the same medical assistance.

Familial factors

Although many instances of familial aggregations of leukemia and other HSN have long been reported, it is uncertain what role, if any, the genetic factors play in the genesis of these diseases. Some familial aggregations were truly very impressive [10, 23, 43], but the possibility that these aggregations occurred merely by chance or were caused by environmental factors was not discounted. For instance, in 1971 one of us reported 5 familial aggregations [56], one of these was integrated by 3 leukemias: a couple and the sister of the wife. This aggregation can be considered as a cluster imputable to environmental factors. On the other hand, another family constituted by an uncle and his nephew who did not know each other; if this is not a chance aggregation it can be imputed to a hereditary factor. Only epidemiological research can determine if these aggregations exceed expectation. It is also important to study the incidence of HSN in both spouses.

The reports of case-referent studies using unmatched controls [34, 58], found a higher incidence of HSN in the relatives of the cases. In studies in which controls were matched considering sex and age, differences were observed in some [22, 64] but not in others [42]. When population statistics were used as control, no differences were observed in most studies [22].

In our study, the incidence of cancer and HSN in the relatives of patients and

controls were very similar: moreover, the proportional mortality observed was slightly smaller than the one observed in Argentina in 1970 (Cases 1.18, controls 1.13, Argentina 1.38). We expected this small difference, because many relatives with HSN were diagnosed many years ago, when diagnostic methods were less developed.

Many of the reports of familial aggregations were related to chronic lymphocytic leukemia. Gunz and Veale [24] planned with great care a case-referent study using as controls population statistics and found that leukemia was more common among first degree relatives of patients with CLL. In our study, LD was the only subclass in which an excess of HSN among relatives was observed. The same was found in the spouses where the differences were not significant. The studies of concomitance of leukemia in identical twins showed a clear excess, but this fact was attributed to an intrauterine environmental factor rather than to heredity specially considering that the risk disappears when the healthy twin reaches the age of 7.

How can all these discordant observations be interpreted? It is very difficult. Undoubtedly, some families have a predisposition, specially in the association of leukemia with hereditary diseases such as constitutional aplastic anemia, ataxia-teleangiectasia, familial neurofibromatosis, etc. It is possible that in chronic lymphocytic leukemia, heredity plays a role, but it is also possible, that taking all HSN into consideration, the role played by this factor is small and related to different ethnic groups.

Prenatal factors

Several reports discuss the possible association of prenatal factors with a higher incidence of HSN [38, 65], some of these factors were studied by us. We only found significant differences in the age of the patient's mother at birth and the birth order. Manning and Carroll found that these two factors were not significant [38]. On the contrary, Stewart, Webb and Hewitt observed that leukemic children have older mothers than controls and that there is a great number of firstborn among them [65]. In our research, we confirmed the first of the observations of Stewart et al., but not the second one. On the contrary, we found that there are fewer firstborn among the patients than for the controls. We also observed that these differences were found in patients over 20 and that differences were not imputable to differences in the place of residence of patients and controls. We do not discard that there may be some pitfall we are unaware of. We think that it is very important for investigators to repeat this study. If our observations are confirmed, the possible explanation of this association may be that older age at the time of conception may generate defective individuals possibly related to immunodeficiency. It will be interesting to study the father's age at patient's birth.

Environmental factors

In Argentina, a high mortality caused by lymphomas and multiple myelomas has been reported in areas where water has a high arsenic content [53]. Ott [46] reported that HSN, except leukemias, were considerably higher than expected in autopsies of patients exposed to arsenicals. Subsequently, a greater incidence of HSN in people exposed to arsenicals was reported [3, 5, 19, 55, 66]. Chromosome aberrations have been found in the lymphocytes of people exposed to arsenic [47]. One of the objectives of this study was to confirm these reports. Though the difference observed in the Central region may be attributed, at least partially, to migration of patients, when LD and HD pairs are compared, we can assume that migration plays little role if any, because a difference is not observed in another region with similar medical conditions, that is the Littoral (Table 8). All these observations are not conclusive and it is possible that arsenic only acts as a co-carcinogen.

Transmission of Hodgkin's disease and other HSN in schools has recently been discussed [21, 69, 71]. The results of studies on clusters of leukemias remain controversial. We did not find differences in the interpersonal contact with cancer or other

TABLE 8. — *Place of residence. Lymphoproliferative disorders and Hodgkin's disease pairs*

Place of residence	Cases	Controls
Buenos Aires (City and province)	274	288
Littoral	17	16
Central region	13	4 α
North-western region	2	7
Andean region	5	6
Patagonia	5	6

α $p = 0.03$; $R = 3.24$.

HSN patients. The greater incidence of Hodgkin's disease among wood workers and people exposed to pine trees has been previously noted [1, 40, 63]. We did not observe differences after exposure to pinaceae.

Chronic exposure to benzene is an environmental hazard increasing the risk of ANLL. Recently some reports seemed to establish a similar risk after exposure to petroleum. This factor has been associated with a greater incidence of ANLL [11], lymphomas [36], leukemia and HD [48]. Petroleum contains 6-8 % benzene. Likewise, an excess was reported of all or some HSN in people exposed to several chemical factors: ethylene oxide production workers [27], workers employed in the pharmaceutical industry [67], chemists [7, 62], people exposed to pesticides [29, 30], printing plant workers exposed to lead [20], etc. We found an excess of occupations related to petroleum exposure in the HSN and mainly in the ANLL subclass. Moreover, it was observed that more MD, LD and HD patients stated having been habitually exposed to petroleum. It is interesting to note that these differences were only observed in urban areas. However, we consider that the observations about habitual exposure have less validity because of some inaccuracy in this information. The same can be said of the high exposure to insecticides observed in HSN patients. These results must be considered as preliminary.

The evidence that HSN is associated with animal contact is not conclusive. Avian leukosis was the first malignant disease shown to be infectious. The incidence of bovine leukosis may be as high as 10 % in the cattle at risk per year; the etiological factor is the presence of the bovine leukemia virus in some animals of the herd. In Szczecin province, Poland, a correlation was observed between the incidence of human and bovine leukemias [60]. In Iowa and in Scandinavia [15, 41] an association was also reported between the number of cows and the incidence of human leukemia. In Nebraska, an elevated risk of leukemia in farmers was reported [8] and in Germany a high incidence of Hodgkin's disease in children who resided in rural areas was also found [17]. However, seroepidemiological studies carried out in people exposed to cattle with lymphosarcoma did no find sera positive for viral antibodies [16]. Feline leukemia is the most frequently diagnosed neoplasm in domestic cats. In urban Glasgow, about 50 % of all adult cats show antibody to feline leukemia virus [31]. The case-control studies with pets (animal-human or human-animal) were not conclusive; apparently there are more reports disagreeing with this relationship than affirming it [59] We analyzed three types of exposure: habitual contact, co-habitation and animal wound. Of the first two, it seems more interesting to discuss co-habitation because this implies a greater degree of exposure. On the other hand, we consider that there is some inaccuracy in the information about habitual contact. We must also take into account that the number of animals and the length of co-habitation were not investigated. We did not obtain identical results when analysing patients from Buenos Aires and those from the rest of Argentina. In the former group, we found more co-habitation cases with dogs and other animals while in the latter, significant differences were not observed. In our opinion, people living in Buenos Aires, have smaller living areas which ultimately cause a greater degree of animal contact. We can assume that the contradictory results found in case referent studies may be due to differences in the type of exposure analysed. A new study is being planned in order to analyze length of co-habitation, number of animals, etc. Finally, it must be borne

in mind that many patients were in contact with different kinds of animals. Therefore, the existence of a causal relationship for HSN with an animal can determine a spurious association with another kind of animal.

Personal factors. Nearly all personal factors investigated in this study have been reported elsewhere to be related to the incidence of HSN [12, 13, 32, 64, 68, 70]. We only found a higher frequency of simian and/or Sydney folds in ALL patients than in controls considering at least one complete fold. It is interesting to point out that the number of people with these folds in both groups is smaller than that reported by Wertelecki et al.[70]. These authors found in ALL patients: Sydney fold 20 %, simian fold 10.6 %, as compared with two control groups: A) 219 Caucasians from the Charleston area, Sydney fold 2.7 %, simian fold 2,7 %; B) 407 Caucasians from the Boston area, Sydney fold 8.6 %, simian fold 6.4 %. The differences between these control groups were significant. We can assume that the frequency of these folds changes in the different populations.

Socioeconomical factors. Some reports have pointed out differences according to socioeconomical distribution [48]. We did not find any such difference.

Summary

The results of a case-control study carried out in 603 hemopoietic system neoplasms (HSN) from 16 medical centers in Argentina are presented. The case group was integrated by 153 acute lymphocytic leukemias (ALL), 70 acute nonlymphocytic leukemias (ANLL), 51 myeloproliferative disorders (MD), 196 lymphoproliferative disorders (LD) and 133 Hodgkin's disease (HD). The control groups consisted of 603 non neoplastic patients of the same sex and age group from the same hospitals. The following results are worth mentioning:

1. *In ANLL patients, fewer people born in Spain or Portugal or with the same familiar origin were observed, furthermore fewer patients having green, blue or grey eyes were found. On the other hand, there were more people born in Italy.*
2. *Fewer LD born in the North-western region of Argentina were observed. Moreover, there were fewer Chileans, Bolivians or Paraguayans among the ancestors of these patients. On the other hand, more LD born in Spain or Portugal were found.*
3. *In HD patients more people born in Italy were observed. On the other hand fewer people born in Spain or Portugal or with the same familial origin were found.*
4. *No differences were observed in the proportional mortality caused by cancer or HSN among relatives and spouses.*
5. *Fewer HSN were born from young mothers (under 30) or were firstborns. These differences were observed both in children and in adults. ALL patients have a higher proportion of simian and/or Sydney folds.*
6. *More LD and HD patients (analyzed as a whole) were observed residing in the Central region of Argentina, where there are areas with arsenical waters.*
7. *In the HSN patients and specially in ANLL, a greater number of occupations connected with constant exposure with petroleum was observed.*
8. *More ALL and HD patients had cohabited with dogs, more ALL patients with cats and more LD patients with birds. These differences were only observed in residents of Buenos Aires city and its surroundings.*

Resumen

Estudio epidemiológico retrospectivo de las neoplasias del sistema hematopoyético en la Argentina.

Se presentan los resultados de un estudio caso-control efectuado en 603 neo-

plasias del sistema hematopoyético (NSH) procedentes de 16 centros médicos de la Argentina.

El grupo caso estaba integrado por 153 leucemias linfáticas agudas (LLA), 70 leucemias agudas no linfáticas (LANL), 51 síndromes mieloproliferativos (SM), 196 síndromes linfoproliferativos (SL) y 133 enfermedades de Hodgkin (EH). El grupo control consistió en 603 pacientes no neoplásicos del mismo sexo y grupo etario y procedentes de los mismos hospitales. Se destacan los siguientes resultados:

1. *Entre los pacientes con LANL se encontró una menor cantidad de personas nacidas en España o Portugal o de ese mismo origen familiar, así como de enfermos con ojos verdes, azules o grises. Por el contrario, fue mayor el número de los nacidos en Italia.*
2. *Entre los SL hubo un menor número de personas nacidas en el Noroeste argentino o cuyas familias fueron originarias de Chile, Bolivia o Paraguay y una mayor cantidad de pacientes nacidos en España o Portugal.*
3. *Entre las EH fue mayor la cantidad de personas nacidas en Italia. Al contrario, fue menor el número de los nacidos en España o Portugal o cuyos antepasados procedían de esos países.*
4. *No hubo diferencias en la mortalidad proporcional causada por cáncer o NSH entre los consanguíneos y cónyuges.*
5. *Una menor cantidad de NSH eran hijos de madres jóvenes (menores de 30 años) o primogénitos. Esto se vio tanto en niños como en adultos. Las LAL presentaron una mayor proporción de pliegues simio y/o Sydney.*
6. *Mayor cantidad de SL y EH (analizados en conjunto) residían en la región central del país, donde existen áreas cuyas aguas tienen un elevado contenido de arsénico.*
7. *En las NSH y especialmente en las LANL se encontró una mayor cantidad de ocupaciones vinculadas a una exposición permanente al petróleo o sus derivados.*
8. *Entre las LLA hubo una mayor convivencia con perros y/o gatos, en las EH con perros y en los SL con aves. Esto se registró en los residentes del Gran Buenos Aires solamente.*

Acknowledgment: The authors are grateful to Liga Argentina de Lucha contra el Cancer (LALCEC) and to Banco de Crédito Argentino for supporting this investigation.

Bibliografía

1. Acheson ED: Hodgkin's disease in woodworkers. *Lancet* 2: 988, 1967.
2. Axelson O: The case referent (case control) study in occupational health epidemiology. *Scand J Work Environ & Health* 5: 91, 1979.
3. Axelson O, Dahlgren E, Jansson CD, Rehnlund SO: Arsenic exposure and mortality. A case referent study from a Swedish copper smelter. *Br J Ind Med* 35: 8, 1978.
4. Axtell LM, Myers MH: Contrasts in survival of black and white cancer patients, 1960-73. *J Natl Cancer Inst* 60: 1209, 1978.
5. Baetjer AM, Lilienfeld AM, Levin ML: Quoted by J. R. Goldsmith in Geographical pathology as a method for detecting occupational cancer. *J Occup Med* 19: 533, 1977.
6. Bancroft H: Introducción a la bioestadística. EUDEBA, Buenos Aires, 1960.
7. Beekmans W: Cancer risk of chemists. *Cancergram Series* CK 02 Nº 9, 1979.
8. Blair A, Thomas TL: Leukemia among Nebraska farmers: a death certificate study. *Am J Epidem* 110: 264, 1979.
9. Blattner WA, Blair A, Mason TJ: Multiple myeloma in the United States, 1950-69. *Proc Am Assoc Cancer Res* 21: 482, 1980.
10. Blattner WA, Strober W, Muchmore AV, Blaese RM, Broder S, Fraumeni JF: Familial chronic lymphocytic leukemia. Immunologic and cellular characterization. *Ann Intern Med* 84: 554, 1976.
11. Brandt L, Nilsson PG, Mitelman F: Occupational exposure to petroleum products in men with acute non-lymphocytic leukemia. *Br Med J* 1: 553, 1978.
12. Cohen T, Creger WP: Acute myeloid leukemia following seven years of aplastic anemia induced by cloramphenicol. *Am J Med* 43: 762, 1967.
13. Davignon L et al.: BCG vaccination and leukemia mortality. *Lancet* 1: 80, 1971.
14. Dixon WJ, Massey FJ: Introduction to statistical analysis. McGraw-Hill Book Company Inc. New York, 1967.

15. Donham KJ: Relationships of human and bovine leukaemia. Directory of On-going research in Cancer Epidemiology, International Agency for Research of Cancer, Lyon, 1979 Project Nº 816.
16. Donham KJ, Van Der Maaten MJ, Miller JM, Kruse BC, Rubino MJ: Seroepidemiologic studies on the possible relationship of human and bovine leukemia. *J Natl Cancer Inst* 59: 851, 1977.
17. Dorken H: Zur Epidemiologie des Morbus Hodgkin. *Klinikarzt* 7: 685, 1978.
18. Githens JH et al.: The relation of socioeconomic factors to incidence of childhood leukemia: *Public Health Rep* 80: 573, 1965.
19. Goldsmith JR: Geographical pathology as a method for detecting occupational cancer. *J Occup Med* 19: 533, 1977.
20. Greene MH, Hoover RN, Eck RL, Fraumeni JF: Cancer mortality among printing plant workers. *Environ Res* 20: 66, 1979.
21. Grufferman S, Cole P, Levitan TR: Evidence against transmission of Hodgkin's disease in high schools. *N Engl J Med* 300: 1006, 1979.
22. Gunz FW: Incidence of some aetiological factors in human leukemia. *Br Med J* 1: 326, 1961.
23. Gunz FW, Gunz JP, Vincent PC, Bergin M, Johnson FL, Bashir H, Kirk RL: Thirteen cases of leukemia in a family. *J Natl Cancer Inst* 60: 1243, 1978.
24. Gunz FW, Veale AMO: Leukemia in close relatives. Accident or predisposition? *J Natl Cancer Inst* 42: 517, 1969.
25. Haenszel W: Stomach cancer, incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst* 21: 213, 1958.
26. Haenszel W. Kurihara M: Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst* 40: 43, 1968.
27. Hogstedt C, Rohlen O, Berndtsson BS, Axelson O, Ehrenberg L: A cohort study of mortality and cancer incidence in ethylene oxide production workers. *Br J Ind Med* 36: 276, 1979.
28. Horwitz RI, Feinstein AR: Methodologic standards and contradictory results in case control research. *Am J Med* 66: 556, 1979.
29. Infante PF: Blood dyscrasias and childhood tumors and exposure to chlordane and heptachlor. *Scand J Work Environ Health* 4: 137, 1978.
30. Infante PF, Epstein SS: Blood dyscrasias and childhood tumors and exposure to chlorinated hydrocarbon pesticides. *Cancergram Series* CKO2, Nº 4, 1978.
31. Jarrett O: Infectious leukemias in domestic animals. *Haematol Blood Transfus* 23: 439, 1979.
32. Jensen MK, Roll K: Phenylbutazone and leukemia. *Acta Med Scand* 178: 505, 1965.
33. Jiménez de Asúa F, Abaurrea C: Influencia del factor subracial en la frecuencia de la leucemia. *Anales científicos Centro Gallego Buenos Aires* 5: 44, 1956.
34. Kaliampetsos V: Kommen Blutkranheiten und Karzinome unter den Verwanten von Leukamiekranken gehäut vor? *Dtsch Med Wschr* 79: 1783, 1954.
35. Knudson AG: Ethnic differences in childhood leukemia as revealed by a study of antecedent variables. *Cancer* 18: 815, 1965.
36. Low H: Health effects of petroleum extender oils. *J Elastomers & Plastics* 10: 229, 1978.
37. Mac Mahon B, Koller EK: Ethnic differences in the incidence of leukemia. *Blood* 12: 1, 1957.
38. Manning MD, Carroll BE: Some epidemiological aspects of leukemia in children. *J Natl Cancer Inst* 19: 1087, 1957.
39. Mantel N, Haenszel W: Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst* 22: 719, 1959.
40. Milham S, Hesser JB: Hodgkin disease in woodworkers. *Lancet* 2: 136, 1967.
41. Mititelu G: Correlation between consumption of dairy products and human leukemia and lymphoma. Directory of On-going research in Cancer Epidemiology, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1979, Project Nº 473.
42. Morganti C, Cresseri A: Nouvelles recherches génétiques sur les leucémies. *Sang* 25: 421, 1954.
43. Nagel GA, Nagel-Studer E, Seiler W, Hofer HO: Malignant lymphoma in four of five siblings. *Int J Cancer* 22: 675, 1978.
44. OMS: Mortalité due a la maladie de Hodgkin et a la leucémie. *Rap épid demogr* 18: 410, 1965.
45. OMS: Leucémie et aleucémie. *Rapp Statis Sanit Mond* 22: 544, 1969.
46. Ott MG, Holder BB, Gordon HL: Respiratory cancer and occupational exposure to arsenicals. *Arch Environ Health* 29: 250, 1974.
47. Petres J, Hundeiker M: Chromosomen pulverization nach arsenein wirkung auf zell kulturen in vitro. *Arch Klin exp Derm* 231: 366, 1968.
48. Plotnikow Y: Occupational characteristics of patients with leukemia and lymphogranulomatosis. *Cancergram Series* CKO2 Nº 6, 1978.
49. Podestá LD, Calcagno EJ, Lajous JR, Rivero C: Incidencia y mortalidad por leucemias y linfomas en un área de la Provincia de Buenos Aires. I. Leucemias. *Sangre* 12: 53, 1967.
50. Podestá LD, Calcagno EJ, Quiroga Micheo E: Epidemiología de las leucemias y de los linfomas en la Provincia de Buenos Aires (República Argentina). Años 1965 a 1968 inclusive. XIV International Congress of Hematology. São Paulo (Brazil) 1972.
51. Podestá LD, Calcagno EJ, Quiroga Micheo E, Fernández A: Epidemiología de las leucemias y de los linfomas en un área de la Provincia de Buenos Aires. Año 1967. I. Leucemias. *Sangre* 16: 45, 1971.
52. Podestá LD, Quiroga Micheo E, Calabria SI: Incidencia y mortalidad por leucemias y linfomas en un área de la Provincia de

Buenos Aires. II. Linfomas. *Sangre* 12: 181, 1967.
53. Podestá LD, Quiroga Micheo E, Calcagno EJ: Epidemiología de las leucemias y de los linfomas en la República Argentina. *Rev Hospital (Bs Aires)* 1: 50, 1973.
54. Podestá LD, Quiroga Micheo E, Calcagno EJ, Calabria SI, Olivos N: Epidemiología de las leucemias y de los linfomas en un área de la Provincia de Buenos Aires, año 1967. II. Linfomas. *Sangre* 16: 258, 1971.
55. Quiroga Micheo E, Calcagno EJ, de Sijvarger SR, Calabria SI, Maccione E, Besuschio SC, Magnasco JH, Barros C, Sackmann Muriel F, de Soto ZC: Epidemiology of Hemopoietic System Neoplasms in Argentina. *Biol Trace Elements Res* 1: 183, 1979.
56. Quiroga Micheo E, Garate E: Leucemia familiar. *Rev Arg Med Int y Ter Clín* 2: 221, 1971.
57. Quiroga Micheo E, Rando A, Quiroga Vergara ER: Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y cde/cde según la provincia de nacimiento. *Rev Arg de Transfusión* 2: 2, 1978.
58. Razis DV, Diamond HD, Craver LF: Familial Hodgkin disease, its significance and implications. *Ann Inter Med* 51: 933, 1959.
59. Reif JS: Epidemiology of leukemia in pet animals with special reference to zoonotic aspects. *Medicina (Bs Aires)* (Supl 1): 77, 1974.
60. Rybkowski W: Leukemia morbidity in two neighboring regions of Szczecin province. Poland. *Cancergram Series* CKO2, Nº 10, 1978.
61. Sánchez Medal L, Arriaga de la Cabada L: La frecuencia de los padecimientos hematológicos en México. Análisis de enfermos vistos en consulta privada. *Rev Invest Clín (Méx)* 28: 301, 1976.
62. Searle CE, Waterhouse AH: Epidemiological study of the mortality of British chemists. *Br J Cancer* 38: 192, 1978.
63. Spiers PS: Hodgkin's disease in workers in the wood industry. *Public Health Rep* 84: 385, 1969.
64. Stewart A: Aetiology of childhood malignancies. Congenitally determined leukemias. *Br Med J* 1: 452, 1965.
65. Stewart A, Webb J, Hewitt D: A survey of childhood malignancies. *Br Med J* 1: 1495, 1958.
66. Sunderman FW: Personal communication.
67. Thomas TL, Decoufle P: Mortality among workers employed in the pharmaceutical industry. A preliminary investigation. *J Occup Med* 21: 619, 1979.
68. Vianna NJ, Greenwald P, Davies JNP: Tonsillectomy and Hodgkin's disease: the lymphoid tissue barrier. *Lancet* 1: 431, 1971.
69. Vianna NJ, Greenwald P, Davies JNP: Extended epidemic of Hodgkin's disease in High-school students. *Lancet* 1: 1209, 1971.
70. Wertelecki W, Plato CC, Fraumeni JF, Niswander JD: Dermatoglyphies in leukemia. *Pediat Res* 7: 620, 1973.
71. Zack MM, Heath CW, Andrews MD, Grivas AS, Christine BW: High school contact among persons with leukemia and lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 59: 1343, 1977.

Debe procurarse que la Universidad sea el centro de producción filosófica. científica y aún industrial de la Nación, como lo es en Alemania y Estados Unidos.

Bernardo A. Houssay (1887-1971)
Instituto Popular de Conferencias, 1929.

 ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 201-208 (1981)

PROLAPSO VALVULAR MITRAL Y ENDOCARDITIS INFECCIOSA

J. H. CASABE, E. A. SAMPO, NELLY NAHMOD, O. GENNARO

Instituto Modelo de Clínica Médica, IV Cátedra de Medicina, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires

El prolapso valvular mitral es un síndrome que actualmente se diagnostica con frecuencia, presentando una prevalencia aparente del 4-6 %[15]. La mayoría de los pacientes con este síndrome son asintomáticos y tienen un curso benigno, compatible con una vida normal[12]. Sin embargo, esta patología puede producir muerte súbita[18], arritmias graves[3, 16], insuficiencia mitral grave[6], presentando además una susceptibilidad aumentada hacia la endocarditis infecciosa[4, 11]. El motivo de este trabajo es el de analizar cinco casos de prolapso valvular con insuficiencia mitral y endocarditis infecciosa observados en el Instituto durante un período de 14 meses.

Casos clínicos

Caso nº 1

Paciente: C. R., mujer, 21 años. Historia Clínica nº 121 386. Ingresó: 7-I-1980. Egresó: 28-I-1980.

Motivo de internación: Síndrome febril prolongado. Tumoración cervical.

Antecedentes de la enfermedad actual: Comienza hace cuatro meses con hipertermia, siendo internada en otro hospital con diagnóstico de endocarditis infecciosa con hemocultivos positivos para Estreptococo gamma. Se la trató con Penicilina G sódica-60 000 000 U/día/EV y Gentamicina, 80 mg IM cada 8 horas. Durante la tercera semana de tratamiento apareció una masa en la región cervical derecha, que fue aumentando progresivamente de tamaño, por lo que es derivada al Instituto Modelo. Al examen físico la paciente impresionaba como gravemente enferma. Su PA era de 140/90, PR 120/min, t° axilar 38.5° C, y t° rectal 39° C. Presentaba una tumoración de 3 cm x 4 cm, pulsátil, en región cervical derecha, que se extendía hasta la altura del borde superior del cartílago tiroides, sin frémito ni soplo auscultable. Se acompañaba de Síndrome de Claude Bernard-Horner derecho y desviación de la úvula y de la lengua hacia la izquierda. El latido cardíaco externo se veía y se palpaba en el quinto espacio intercostal izquierdo, 2 cm por fuera de la línea hemiclavicular, amplio, extenso y fugaz, percibiéndose un frémito sistólico. En foco mitral se auscultaba: primer ruido intenso, soplo holosistólico ++++/6, regurgitativo, con irradiación a axila, segundo ruido normal y un tercer ruido. Laboratorio: Hto 25 %, eritrosedimentación 120 mm y 17 400 leucocitos/mm³. El ECG mostraba taquicardia sinusual con trastornos de la repolarización ventricular en cara diafragmática y anterior y en la radiografía de tórax el corazón era de tamaño normal. El ecocardiograma en modo M (Fig. 1) mostró un prolapso holosistólico de la válvula mitral con ecos múltiples compatibles con vegetaciones, hiperquinesia septal y de la pared posterior del ventrículo izquierdo y tamaño auricular y ventricular izquierdos dentro de los límites normales. *Evolución:* Se intervino quirúrgicamente la tumoración en región cervical derecha, hallándose un seudoaneurisma de carótida interna, originado por una fisura en la bifurcación carotídea y material purulento en la cavidad parafaríngea, extirpándose toda la tumoración. Se inició tratamiento con Penicilina 24 000 000 U/día/EV y Gentamicina 80 mg/cada 8 horas/IM, debiendo susti-

— — — —

Recibido: 15-XII-1980. Aceptado: 30-III-1981.

Dirección postal: IV Cátedra de Medicina, Hospital de Clínicas José de San Martín, Av. Córdoba 2351, piso 11, 1120 Buenos Aires, Argentina.

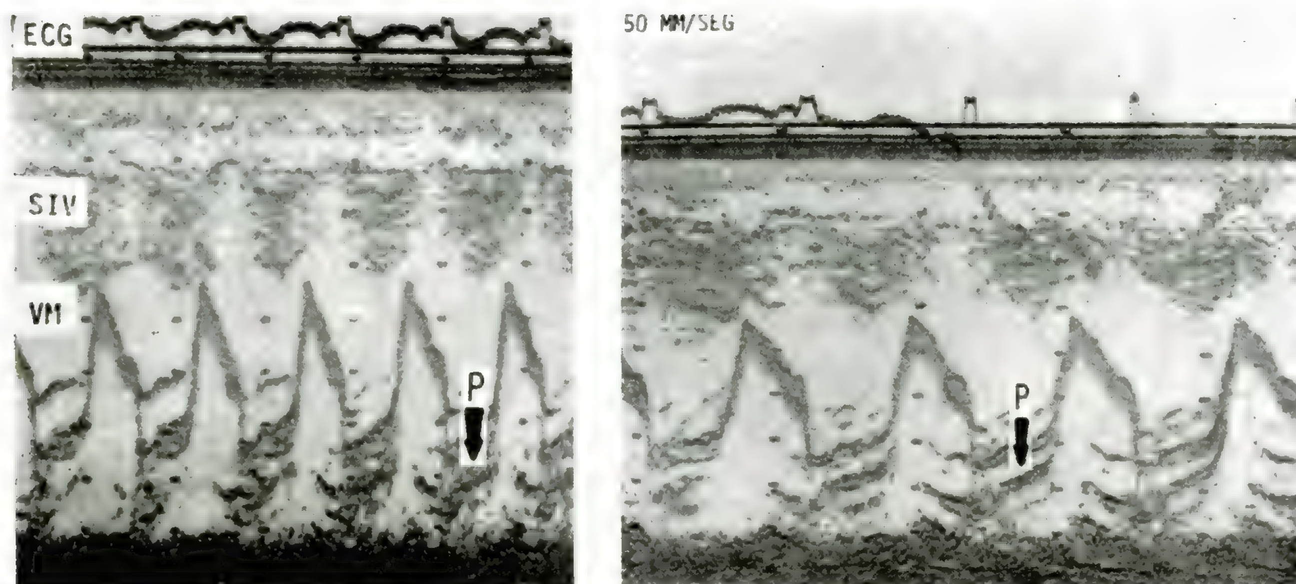


Fig. 1 (Caso nº 1).. — A la izquierda se observa, en un nivel ultrasónico 2, el prolapso holosistólico de la válvula mitral. Sobre la valva anterior se visualizan ecos múltiples, compatibles con vegetaciones, que se observan mejor a la derecha, en un registro a mayor velocidad. SIV = septum interventricular; VM = válvula mitral; P = prolapso.

tuirse posteriormente por Eritromicina 1g/cada 8 horas/oral, y Tobramicina 1 g/K/cada 8 horas/IM por presentar importante toxidermia. Presentó signos de insuficiencia cardíaca que se pudieron controlar con digital y diuréticos. Luego de completadas cuatro semanas de tratamiento se le dio de alta, afebril y muy mejorada.

Caso nº 2

Paciente: M. V., mujer, 32 años. Historia Clínica nº 123.970. Ingresó: 13-III-1980. Egresó: 31-III-1980.

Motivo de internación: Valoración de su cardiopatía.

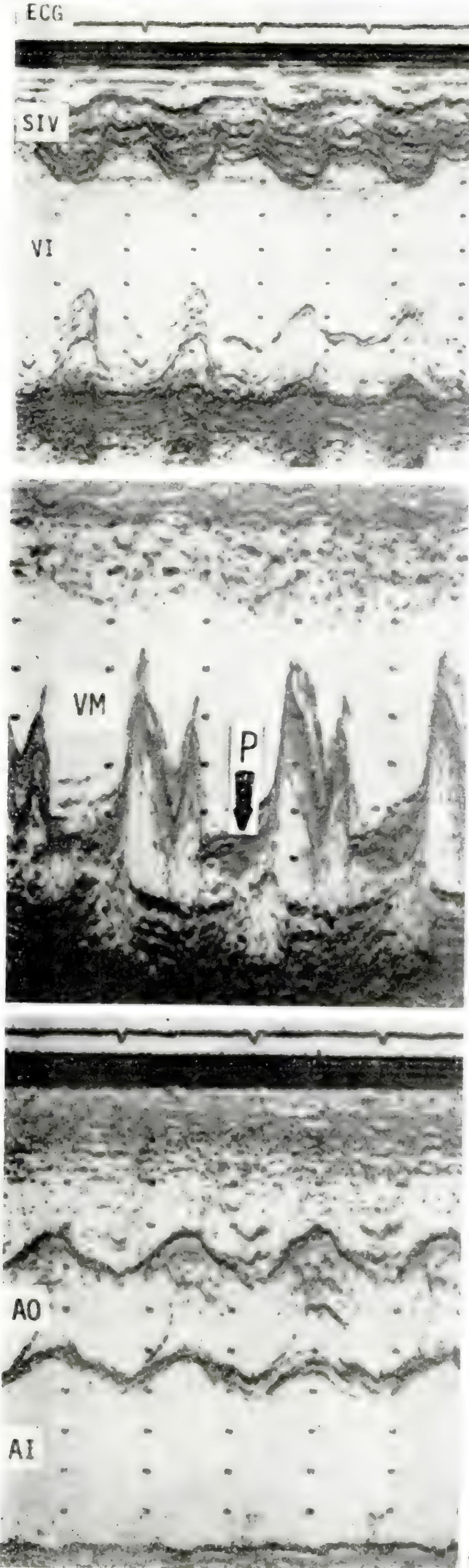
Antecedentes de la enfermedad actual: A los 14 años le diagnostican fiebre reumática, medicada con reposo y Penicilina. No recibe profilaxis antibiótica, y a los 20 años sufre una aparente recidiva de su enfermedad, tratada con Penicilina. En julio de 1979 presenta hipertermia, disnea, edemas y hematuria, diagnosticándose endocarditis infecciosa con hemocultivos positivos a *Estreptococo viridans*. Recibe digital, diuréticos y Penicilina G sódica durante cuatro semanas, permaneciendo afebril desde entonces. En octubre de 1979 presenta bruscamente hemiparesia izquierda con intensa cefalea. La arteriografía cerebral fue compatible con una embolia cerebral en el territorio de la arteria cerebral media derecha. La paciente estaba lúcida, afebril, con una PA 130/80 y PR 84/min. Se veía y se palpaba un latido cardíaco externo en quinto espacio intercostal izquierdo sobre línea hemiclavicular. En foco mitral se auscultaba: primer ruido aumentado de intensidad, soplo holosistólico regurgitativo ++++/6 irradiado a axila, y segundo ruido normal. Presentaba además una hemiparesia izquierda a predominio faciocrural. El ECG presentaba un ritmo sinusal a una frecuencia de 84/min. La radiografía de tórax con relleno esofágico mostró un franco agrandamiento auricular izquierdo. El ecocardiograma en modo M (Fig. 2) permitió visualizar una válvula mitral redundante con prolapso holosistólico, dilatación diastólica del ventrículo izquierdo con hiperquinesia del septum y de la pared posterior, compatibles con sobrecarga de volumen, y dilatación auricular izquierda. Se le dio de alta, derivándose para estudio hemodinámico.

Caso nº 3

Paciente: C. A. L., hombre, 34 años. Historia Clínica nº 111.537. Ingresó: 3-IV-1980. Egresó: 5-V-1980.

Motivo de internación: Síndrome febril prolongado.

Antecedentes de la enfermedad actual: Comienza cuarenta días antes con hipertermia de 39° C, escalofríos y diaforesis. Fue tratado sucesivamente con eritromicina, ampicilina y amoxicilina durante 12 días, permaneciendo afebril durante el tratamiento, para reaparecer la hipertermia una vez finalizado el mismo. Debido a un progresivo deterioro de su estado general, con anorexia y pérdida de peso, se interna en el Instituto Modelo. Al examen físico el paciente presentaba un hábito longilíneo, un pulso arterial dícroto, con latido cardíaco externo en 6º espacio intercostal 2 cm por fuera de la línea medioclavicular, extenso (3 cm) y fugaz. En foco mitral se auscultaba: primer ruido intenso, soplo mesotelesistólico ++++/6 y 2º ruido normal. Presentaba además petequias conjuntivales y esplenomegalia. El ECG mostró ritmo sinusal con hipertrofia y sobrecarga ventricular izquierda y la radiografía de tórax elongación del tracto de



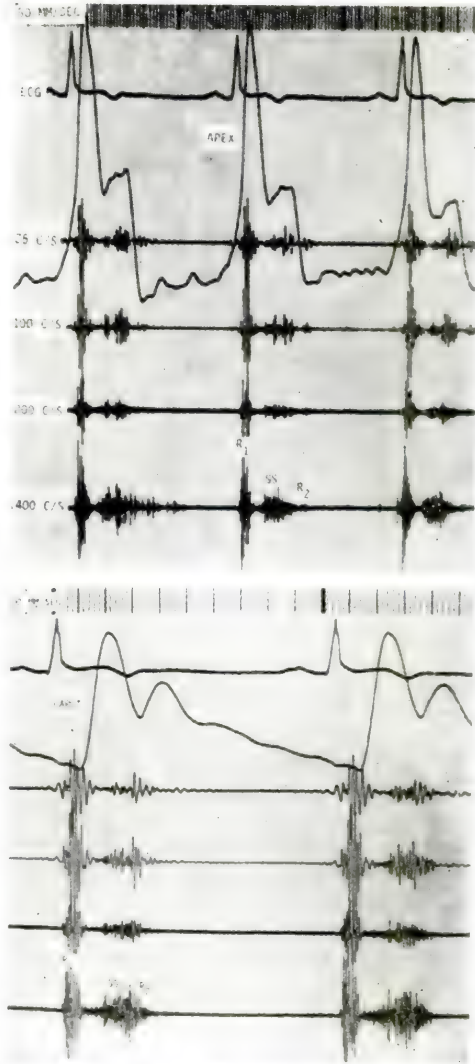


Fig. 3 (Caso nº 3). — Fonomecanocardiograma. **Arriba:** registro en foco mitral con apexcardiograma y fonocardiograma con cuatro filtros diferentes. Se observa el colapso mesosistólico del apexcardiograma y un soplo mesotelesistólico de características agudas. **Abajo:** Registro a mayor velocidad, en foco mitral, con carotidograma y fonocardiograma con 4 filtros. El carotidograma presenta una importante onda dícrota y una eyección acortada (220 m/seg). APEX = Apexcardiograma; CAROT = carotidograma; R 1 = primer ruido; SS = soplo mesotelesistólico; R 2 = segundo ruido; C/S = ciclos por segundo.

— — — —

Fig. 2 (Caso nº 2). — **Arriba:** en nivel ultrasónico 1. Se observa aumento del diámetro diastólico ventricular izquierdo e hiperquinesia septal y de la pared posterior por sobrecarga de volumen. **Centro:** nivel ultrasónico 2. Se observa el prolapso holosistólico y ecos múltiples sobre la valva anterior de la mitral. **Abajo:** nivel ultrasónico 4. La aurícula izquierda se encuentra dilatada. SIV = septum interventricular. VI = ventrículo izquierdo; VM = válvula mitral; P = prolapso; AO = aorta; AI = aurícula izquierda.

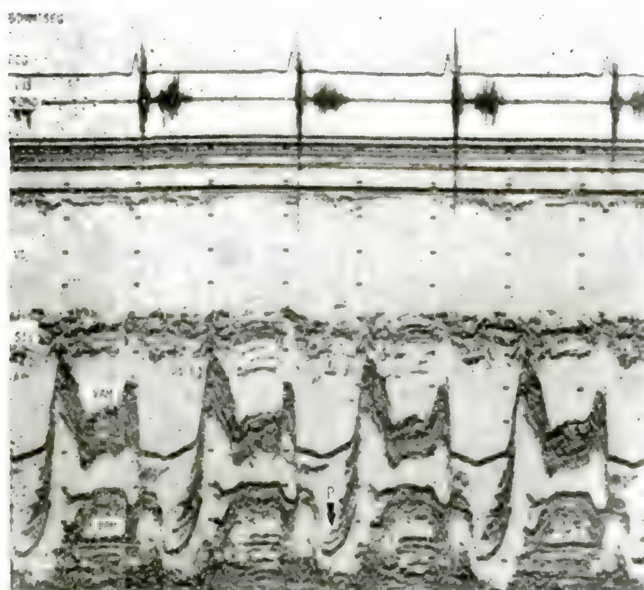


Fig. 4 (Caso nº 3). — Registro simultáneo fonocardiográfico y ecocardiográfico en nivel ultrasónico 2. Se observa el prolapso mesotelesistólico de la válvula mitral, coincidiendo su registro con el inicio del soplo sistólico. Nótese la válvula mitral redundante, con ecos múltiples sobre ambas valvas. FONO = fonocardiograma; VD = ventrículo derecho; SIV = septum interventricular; VAM = valva anterior de la mitral; VPM = valva posterior de la mitral; P = prolapso.

salida del ventrículo izquierdo con rectificación del arco medio pulmonar. Se le efectuó un fonomecanocardiograma (Fig. 3), cuyo resultado fue: primer ruido intenso, soplo mesotelesistólico apical y segundo ruido normal. El carotidograma presentaba eyección acortada y onda dícrota amplia, y el apexcardiograma colapso mesosistólico. El ecocardiograma en modo M (Fig. 4) mostró una válvula mitral redundante con amplia excursión y con un prolapso mesotelesistólico, dilatación diastólica del ventrículo izquierdo con hiperquinesia septal y de la pared posterior. Sobre ambas valvas de la válvula mitral se observaban reverberaciones densas compatibles con vegetaciones, las que se confirmaron mediante ecocardiograma bidimensional. *Evolución:* Hemocultivos negativos. Con tratamiento con Penicilina G sódica 30 000 000 U/día y estreptomicina 1 g durante 4 semanas, evolucionó favorablemente. Presentó extrasistolia ventricular frecuente que se controló con amiodarona oral.

Caso nº 4

Paciente: S. G. R., mujer, 37 años. Historia Clínica nº 133 893. Ingresó: 13-X-1980. Egresó: 4-XII-1980.

Motivo de internación: Síndrome febril, artralgias, petequias.

Antecedentes de la enfermedad actual: En enero de 1979 presentó un cuadro de artralgias, hipertermia y petequias en miembros inferiores. Se interpretó como un LES y se la medicó con corticosteroides, que luego abandonó. Tres meses antes de su internación actual, comenzó con un cuadro similar, siendo derivada a la V Cátedra de Medicina. La paciente se encontraba lúcida, febril, con lesiones purpúricas múltiples en miembros inferiores. El latido cardíaco externo se palpaba en 5º espacio intercostal 1 cm por fuera de la línea medioclavicular. En foco mitral, se auscultaba: primer ruido normal, soplo pansistólico regurgitativo ++++/6 y 2º ruido normal. Se palpaba polo de brazo y riñón derecho. El ECG mostraba taquicardia sinusal y la Rx de tórax elongación del tracto de salida del ventrículo izquierdo. El ecocardiograma en modo M mostró un prolapso holosistólico de la válvula mitral, derrame pericárdico moderado, dilatación del ventrículo izquierdo e hiperquinesia septal y de la pared posterior, compatibles con sobrecarga de volumen. La válvula mitral presentaba "extra ecos" o reverberaciones. Un ecograma bidimensional confirmó estos hallazgos. *Evolución:* Hemocultivos positivos para *Estreptococo viridans*. Se inició tratamiento con Penicilina G sódica 24 000 000 U/día y drogas antihipertensivas. Debido a hipertermia y rash cutáneo, se cambia el antibiótico en el 14º día de tratamiento, por Cefalotina 8 g/día y estreptomicina 1 g/día, evolucionando favorablemente luego de 4 semanas de tratamiento.

Caso nº 5

Paciente: M. M., mujer, 18 años. Historia Clínica nº 11 521. Ingresó: 25-III-1981.

Motivo de internación: Síndrome febril. Artritis.

Antecedentes de la enfermedad actual: A los 10 años presentó un episodio de artralgias que fue rotulado como fiebre reumática con valvulopatía mitral residual. Recibió profilaxis con Penicilina benzatínica 1 200 000 cada 30 días hasta los 16 años.

Un mes antes de su internación actual, comenzó con hipertermia de 38° C, escalofríos y signos de flogosis en ambos tobillos. Recibió fenoximetilpenicilina oral y ante la persistencia del cuadro, se internó en el Instituto Modelo. La paciente estaba lúcida y febril, con petequias en dedos de pie y subconjuntiva derecha y signos de flogosis en ambos tobillos. El latido cardíaco externo se palpaba en 5º espacio intercostal 1 cm por fuera de la línea hemiclavicular. En foco mitral se auscultaba un primer ruido aumentado de intensidad, un soplo holosistólico ++++/6 regurgitativo y un 2º ruido normal. El ECG mostraba una taquicardia sinusal y la Rx de tórax fue normal. El ecocardiograma en modo M mostró prolapso holosistólico de la válvula mitral y signos de sobrecarga de volumen del ventrículo izquierdo. La válvula mitral presentaba "extra ecos" en su contorno. *Evolución:* Se inició tratamiento con Penicilina G sódica 300 000 U/K/día y estreptomicina 1 gr. Se recibieron a los 3 días hemocultivos positivos para *Estreptococo viridans*, por lo que se suspendió la estreptomicina. La paciente evolucionó favorablemente.

Discusión

La susceptibilidad aumentada de los pacientes con prolapso de la válvula mi-

tral hacia la endocarditis infecciosa es un hecho bien reconocido en la literatura [4, 11], pero lo que aun no está claro es su verdadera incidencia. Al respecto, en dos estudios, con un seguimiento promedio de 13 años, en 94 pacientes con esta patología la incidencia resultó ser de 1.8 % y 0.7 %/año [1], respectivamente. Por otra parte, estudios recientes sugieren que el prolapso valvular mitral es la lesión anatomopatológica subyacente en muchos pacientes con regurgitación mitral y endocarditis. Así, Corrigall y col. [4] encontraron prolapso de la válvula mitral como lesión subyacente en 10 de 28 regurgitaciones mitrales aisladas con endocarditis infecciosa. En nuestra sección, de 42 pacientes portadores de prolapso valvular mitral, 6 (14.2 %) presentaron como complicación un cuadro de endocarditis infecciosa (los cinco pacientes que se presentan en este trabajo y además otro paciente con este antecedente comprobado). Por otra parte, de ocho casos de endocarditis infecciosa internados en el Instituto en los últimos 14 meses, tres asentaban sobre la válvula aórtica y los cinco restantes sobre la válvula mitral. De estos últimos, cuatro pacientes (aquí reportados) presentaban prolapso valvular mitral.

La etiología del soplo de regurgitación mitral, sin la ayuda de datos ecocardiográficos, angiográficos o anatomopatológicos es, muchas veces, difícil de determinar, y es probable que soplos producidos por válvulas mitrales prolapsadas no sean diagnosticados si no se dispone de estos elementos. Por otra parte, el ecocardiograma debe ser hecho con los recaudos técnicos necesarios para evitar la posibilidad de falsos positivos. El soplo característico del prolapso sistólico de la válvula mitral es telesistólico o mesotelesistólico con o sin click en su inicio y en algunos casos se transforma en holosistólico al incorporar al paciente [2]. Sin embargo, aproximadamente 30 a 40 % de los pacientes con prolapso valvular mitral diagnosticado mediante la ecocardiografía y la angiografía tienen soplos holosistólicos en ausencia de endocarditis infecciosa [4]. En nuestra casuística, los pacientes Nos. 1, 2, 4 y 5 presentaban soplos holosistólicos y en dos de ellos, que tenían además un primer ruido intenso, existía el antecedente de fiebre reumática. Si en estos pacientes no se hubiera efectuado el examen ecocardiográfico, la patología valvular hubiera sido rotulada seguramente como de origen reumático. De la misma manera, en un estudio [4], 22 de 25 pacientes con insuficiencia mitral por prolapso y endocarditis infecciosa, presentaban soplos holosistólicos y no podrían haber sido identificados como portadores de esta patología sin los datos que proporcionaron la ecocardiografía y la angiografía. La presencia de un soplo holosistólico podría reflejar un deterioro de la función valvular asociado a la infección o alternativamente una sensibilidad aumentada hacia la endocarditis en aquellos pacientes con regurgitación mitral más grave. La ecocardiografía es la única técnica no invasiva disponible actualmente para detectar vegetaciones valvulares [8, 13, 18], siendo aun más sensible que la angiografía [7]. Sin embargo, únicamente se detectan vegetaciones grandes y sólo aproximadamente la mitad de los pacientes con criterios clínicos para endocarditis presentan lesiones manifiestas ecocardiográficas [7]. Por otra parte, debido a que las vegetaciones no involucionan con rapidez, no se puede diferenciar, mediante el ecocardiograma, entre lesiones activas y curadas [13]. La imagen ecocardiográfica de las vegetaciones se describe como una serie de "extra" o "múltiples" ecos adheridos a una de las valvas, de aspecto "velludo" y sin restricción del movimiento valvular [8]. Estas imágenes son más fáciles de detectar en la válvula aórtica que en la válvula mitral [7]. Existen muchas causas posibles de "extra" ecos en la apariencia de una valva [7]. Estos pueden ser vistos en sujetos normales, especialmente durante la sístole o en válvulas con fibrosis y/o calcificación y en valvas oscilantes. En pacientes con prolapso de la válvula mitral, Wann y col. [17] señalaron que se pueden observar ecos indistinguibles de los observados en los pacientes con endocarditis infecciosas. Esto se debe probablemente a las válvulas mixomatosas, redundantes, que presentan múltiples superficies para la producción de ecos. En un estudio [5], 40 % de los pacientes con prolapso valvular mitral sin endocarditis infecciosa pre-

sentaban imágenes sugestivas de vegetaciones. El ecocardiograma en modo M presenta, por lo tanto, limitaciones francas en el diagnóstico de vegetaciones en pacientes con prolapso valvular mitral, pues son frecuentes los falsos positivos. La ecocardiografía en tiempo real, bidimensional, al proveer información espacial concerniente a las estructuras cardíacas tiene, en combinación con la técnica en modo M, un gran valor potencial en la detección de vegetaciones [9]. Sin embargo, con esta técnica puede haber también interpretaciones falsas positivas. En nuestros cinco pacientes se observan ecos múltiples adheridos a ambas valvas mitrales, sugestivos de vegetaciones. En los casos Nros. 3 y 4 se confirmaron mediante ecografía bidimensional. De todas maneras, por lo ya anotado, es difícil aseverar esta afirmación. La conducta terapéutica frente a la documentación ecocardiográfica de las vegetaciones no está aún definitivamente establecida. Según algunas series [10, 17], hasta el 90-100 % de los pacientes con vegetaciones visualizadas por la ecocardiografía requirieron intervención quirúrgica o fallecieron por complicaciones de la endocarditis. Por otra parte, en un trabajo reciente [15] se señala que la visualización ecocardiográfica de vegetaciones identifica a un sub-grupo con mayores riesgos de complicaciones, pero que la decisión del recambio valvular debe hacerse con la integración clínica de múltiples factores. Ninguno de nuestros cinco pacientes fue sometido a cirugía valvular y se mantienen compensados desde el punto de vista cardíaco con tratamiento médico. La decisión del estudio hemodinámico y eventual cirugía se postergó teniendo en cuenta la buena respuesta clínica al tratamiento médico, controlándose su evolución clínica periódicamente para decidir el momento quirúrgico.

Por último, analicemos la conducta actual frente a la profilaxis antibiótica en los pacientes portadores de este síndrome. En la mayoría de los casos comunicados en la literatura, la endocarditis infecciosa apareció en pacientes a los cuales previamente se les había detectado un soplo de regurgitación mitral [15]. Es por ello que, la profilaxis contra la endocarditis se recomienda en todos los pacientes con prolapso valvular mitral que presenten un soplo de insuficiencia mitral. Es cierto que existen casos (muy pocos) de endocarditis en pacientes con un click mesosistólico aislado; sin embargo, el uso rutinario de la profilaxis en este grupo tan grande de pacientes, es poco práctico y su beneficio no ha sido aun comprobado [14].

Resumen

Se presentan cinco casos de endocarditis infecciosa en pacientes portadores de prolapso valvular mitral observados en el término de 14 meses (enero 1980 a marzo de 1981). Estos, juntos con un sexto paciente que presenta el antecedente infeccioso comprobado, representan una incidencia del 14.2 % en nuestra serie de 42 prolapsos valvulares mitrales diagnosticados mediante la ecocardiografía en modo M. Por otra parte, de las 8 endocarditis infecciosas internadas en el Instituto en los últimos 14 meses, 3 asentaron sobre la válvula aórtica y 5 sobre la válvula mitral. De estos últimos, cuatro (aquí presentados) tenían un prolapso valvular mitral como patología subyacente. Cuatro de los casos presentaban un prolapso holosistólico, con soplos indistinguibles clínicamente de una insuficiencia mitral reumática y el diagnóstico etiológico hubiera sido imposible de no mediar el estudio ecocardiográfico. El quinto paciente presentaba un soplo mesotelesistólico característico de esta patología, confirmándose el diagnóstico clínico por medio del uso de técnicas no invasivas. En todos los casos se observó, en el ecocardiograma en modo M, una serie de "extra" ecos sobre ambas valvas mitrales, configurando la imagen característica de vegetaciones. Sin embargo, esto no pudo afirmarse con certeza, debido a las características mixomatosas de las válvulas, que pueden dar lugar a este tipo de imágenes (falsos positivos). Los cinco pacientes se curaron con tratamiento antibiótico, no requiriendo hasta el momento intervención quirúrgica alguna. Un número importante de pacientes con endocarditis infecciosa y prolapso valvular mitral tienen soplos

holosistólicos, que podrían reflejar un deterioro de la función valvular asociado a la infección o, en forma alternativa, una sensibilidad aumentada hacia la endocarditis en aquellos individuos con regurgitación mitral más grave. En estos casos, la única manera de efectuar un diagnóstico correcto es mediante la ecocardiografía o la angiografía. Teniendo esto en cuenta, la incidencia real del prolapso valvular mitral como causa de endocarditis infecciosa debe ser analizada más detenidamente a través de estudios con gran cantidad de pacientes. Recomendamos el uso de profilaxis antibiótica en todo paciente con prolapso valvular mitral que presente soplo de insuficiencia mitral.

Summary

MITRAL VALVE PROLAPSE AND INFECTIVE ENDOCARDITIS.

This study was carried out in a period of 14 months with 8 patients suffering from infective endocarditis. In 3 of them the disease was located in the aortic valve, and in the other 5 patients, in the mitral valve. Four of the latter patients, who are described here, had a mitral valve prolapse as underlying valvular heart disease. Together with another two patients, one with a history of infective endocarditis and the other from another Unit, they represented an incidence of 14.2 % out of 42 mitral valve prolapses diagnosed in our Department, demonstrated by echocardiography in M mode. Four of the five patients presented here, showed an holosystolic prolapse (Figs. 1, 2) with murmurs which were clinically indistinguishable from mitral rheumatic disease, while the fifth patient presented mid-late systolic prolapse, with the typical murmur of this pathology (Figs. 3, 4). In the five patients "extra" echos were observed on both leaflets in echocardiograms (M mode), suggesting images of vegetations. Nevertheless, this could not be assured because of myxomatous characteristics of the valves, which could be giving false images. The five patients recovered with antibiotic treatment. There was no need for surgical procedures. Holosystolic murmurs have been found in an important number of patients with infectious endocarditis and mitral valve prolapse, which could suggest deterioration in valve function associated with infection, or an increased susceptibility towards endocarditis in subjects with more severe mitral regurgitation. In these cases, the only way of reaching a correct diagnosis is with echocardiography or angiography. The real incidence of mitral valve prolapse as the cause of infectious endocarditis should be analyzed in detail, performing studies with an important number of patients. Antibiotic prophylaxis is recommended in all patients with mitral valve prolapse and regurgitant murmur.

Agradecimientos: Los autores agradecen al Dr. J. E. Burucúa, por la inclusión del paciente nº 4, y a la Sra. P. S. Tarris por su valiosa ayuda técnica.

Bibliografía

1. Allen H, Harris A, Leatham A: Significance and prognosis of an isolated late systolic murmur: a 9-to-22-year follow-up. *Br Heart J* 36: 525, 1974.
2. Barlow JB, Bosman CK, Pocock WA, Marchand DP: Late systolic murmurs and non-ejection ("midlate") systolic clicks: and analysis of 90 patients. *Br Heart J* 30: 203, 1968.
3. Campbell RW, Godman MG, Fiddler GI, Marquis RM, Julian DG: Ventricular arrhythmias in syndrome of balloon deformity of mitral valve. Definition of possible high risk group. *Br Heart J* 38: 1053, 1976.
4. Corrigall D, Bolen J, Hancock EW, Popp RL: Mitral valve prolapse and infective endocarditis. *Am J Med* 63: 215, 1977.
5. Chandraratna PAN, Langevin E: Limitation of the echocardiogram in diagnosing valvular vegetations in patients with mitral valve prolapse. *Circulation* 56: 436, 1977.
6. Davis RH, Schuster B, Knoebel SB, Fisch C: Myxomatous degeneration of the mitral valve. *Am J Cardiol* 28: 449, 1971.
7. Dillon JC: Echocardiography in valvular vegetations. *Am J Med* 62: 856, 1977.
8. Dillon JC, Feingenbaum H, Konecke LL, Davis RH, Chang S: Echocardiographic manifestations of valvular vegetations. *Am Heart J* 86: 698, 1973.
9. Gilbert BW, Haney RS, Crawford F, Mc-

Clellan J, Gallis HA, Johnson ML, Kisslo JA: Two dimensional echocardiographic assessments of vegetative endocarditis. *Circulation* 55: 346, 1977.

10. Kisslo J, von Ramm OT, Haney R, Jones R, Juk SS, Behar VS: Echocardiographic evaluation of tricuspid valve endocarditis. *Am J Cardiol* 38: 502, 1976.
11. Lachman AS, Bramwell-Jones DM, Lakier JB, Pocock WA, Barlow JB: Infective endocarditis in the billowing mitral leaflet syndrome. *Br Heart J* 37: 326, 1975.
12. Mills P, Rose J, Hollingsworth J, Amara I, Graige E: Long term prognosis of mitral-valve prolapse. *N Engl J Med* 297: 13, 1977.
13. Roy P, Takij AJ, Giuliani ER, Schattenberg TT, Gau GT, Frye RL: Spectrum of echocardiographic findings in bacterial endocarditis. *Circulation* 53: 474, 1976.
14. Schlant RC, Felner JM, Miklozek CL, Lutz JF, Hurst JW: *Disease-a-month* 25: 47, 1980.
15. Stewart JA, Silimperi D, Harris P, Kent Wise N, Fraker TD, Kisslo SA: Echocardiographic documentation of vegetative lesions in infective endocarditis: Clinical implications. *Circulation* 61: 374, 1980.
16. Swartz MH, Teichholz LE, Donoso E: Mitral valve prolapse: a review of associated arrhythmias. *Am J Med* 62: 377, 1977.
17. Wann LS, Dillon JC, Weyman AE, Feigenbaum H: Echocardiography in bacterial endocarditis. *N Engl J Med* 295: 135, 1976.
18. Winkle RA, López MG, Popp RL, Hancock EW: Life-threatening arrhythmias in the mitral valve prolapse syndrome. *Am J Med* 60: 961, 1976.

— — — —

Nature is nowhere accustomed more openly to display her secret mysteries than in cases where she shows traces of her workings apart from the beaten path; nor is there any better way to advance the proper practice of medicine than to give our minds to the discovery of the usual law of nature, by careful investigation of cases of rarer forms of disease. For it has been found, in almost all things, that what they contain of useful or applicable is hardly perceived unless we are deprived of them or they become deranged in some way.

En ninguna otra parte la Naturaleza acostumbra a exhibir más abiertamente sus secretos que en los casos donde muestra sus huellas fuera del camino trillado; ni hay mejor manera de adelantar la correcta práctica de la medicina que dedicar nuestras mentes al descubrimiento de la ley natural común por la cuidadosa investigación de casos de raras formas de enfermedad. Así se ha encontrado, en casi todos los casos, que aquello que contienen de útil y aplicable es difícilmente percibido a menos que estemos privados de esas cosas o que de alguna manera se alteren.

William Harvey (1578-1657)

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 209-213 (1981)

ENFERMEDAD DE GAUCHER Y GLOMERULOPATIA CON SINDROME NEFROTICO *

M. A. NADAL, A. J. MONSERRAT **, D. GOTLIEB, O. A. LOPEZ BLANCO, R. IOTTI, A. BOSCHI

Sección Nefrología y Medio Interno, Hospital de Clínicas José de San Martín, y II Cátedra de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La infiltración del riñón con células de Gaucher (CG) en el curso de esta tesaurismosis es infrecuente y se la describió comúnmente sin manifestaciones clínicas renales [2, 10]. Sin embargo, hay referencias recientes en la literatura de una glomerulopatía de tipo mesangioproliferativa diagnosticada en esta enfermedad [1, 3, 12].

El propósito de esta publicación es describir otra observación de enfermedad de Gaucher (EG), asociada a una nefropatía con características clínicas e histopatológicas semejantes a las de otros trabajos, y sugerir que las alteraciones glomerulares son debidas a la misma.

CASO CLÍNICO

H. L. L., hombre, 34 años, ingresó el 28-I-1977. Comenzó en 1976 con edema que fue progresivamente aumentando de intensidad y nicturia. La persistencia de estos signos motivó su internación para estudio clínico.

Antecedentes personales: Enfermedad de Gaucher confirmada por el estudio histopatológico del bazo extirpado en 1971. El examen físico mostró un enfermo con piel parduzca y edema generalizado; en el aparato cardiovascular se registró ausencia del choque de la punta; se auscultó un R_4, con R_1 normal y R_2 reforzado en áreas de la base. La presión arterial fue de 170/100 mm Hg y la frecuencia cardíaca de 76/min. En el tórax se comprobó un derrame pleural derecho. El fondo de ojo mostró estrechamiento arteriolar con relación arteriovenosa de 1 a 2. En el abdomen se palpó el hígado muy aumentado de tamaño y consistencia, con el borde a la altura de la línea biilíaca. El resto del examen careció de anormalidades.

Antecedentes heredofamiliares: Sin evidencia familiar de EG.

Estudios complementarios: Fosfatasa ácida no inhibida por L. tartrato 42.5 mUI/ml. Orina con densidad de 1013; proteinuria 5 g/24 h; el sedimento mostró cilindros grasos y cuerpos ovales grasos; proteinograma urinario: albúmina 60 %, $alfa_1$ 5 %, $alfa_2$ 5 %, beta 20 % y gamma globulina 10 %. Clearance de creatinina 37 ml/min, creatininemia 2.9 mg/100 ml, urea 94 mg/100 ml, colesterol 236 mg/100 ml. Proteinograma plasmático: proteínas totales 6.0 g/100 ml, albúmina 2.80, $alfa_1$ 0.25, $alfa_2$ 0.60, beta 0.75 y gamma 1.60 g/100 ml. Un ECG evidenció trastornos en la repolarización de la cara lateral. Una urografía por goteo permitió ver ambos riñones de tamaño normal, pero con eliminación débil de la sustancia de contraste.

El 2-III-1977 se le practicó una biopsia renal a cielo abierto.

Patología renal

El material fue procesado para microscopía de luz, inmunofluorescencia y microscopía electrónica de acuerdo a técnicas descriptas previamente [8]. En el material para microscopía de luz se observaron alrededor de 40 glomérulos en los distintos

Recibido: 28-X-1980. Aceptado: 11-XI-1980.

* Trabajo comunicado en el III Congreso Argentino de Nefrología, octubre 1977.

** Miembro de la Carrera de Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Dirección postal: Sección Nefrología y Medio Interno, Hospital de Clínicas José de San Martín, Córdoba 2351, 1120 Buenos Aires, Argentina.

cortes y en el de microscopía electrónica 5 glomérulos en total.

Microscopía de luz: La mayoría de los glomérulos muestra aumento de la matriz mesangial con aspecto fibrilar y tendencia a la formación de nódulos (Fig. 1). Se observa hipercelularidad mesangial focal y global o segmentaria y ocasionalmente células intracapilares de citoplasma claro y aspecto espumoso; la pared capilar se encuentra con engrosamiento focal y segmentario e infrecuente desdoblamiento. Se visualizan con frecuencia adherencias firmes entre la visceral y la parietal glomerular, como así también escasos glomérulos en oblea. El intersticio muestra focos de fibrosis e infiltrados celulares; en los vasos no se aprecian alteraciones. Existe atrofia tubular en relación con los focos de fibrosis; a nivel de los túbulos contorneados proximales se observa abundante cantidad de imágenes gránulo-hialinas.

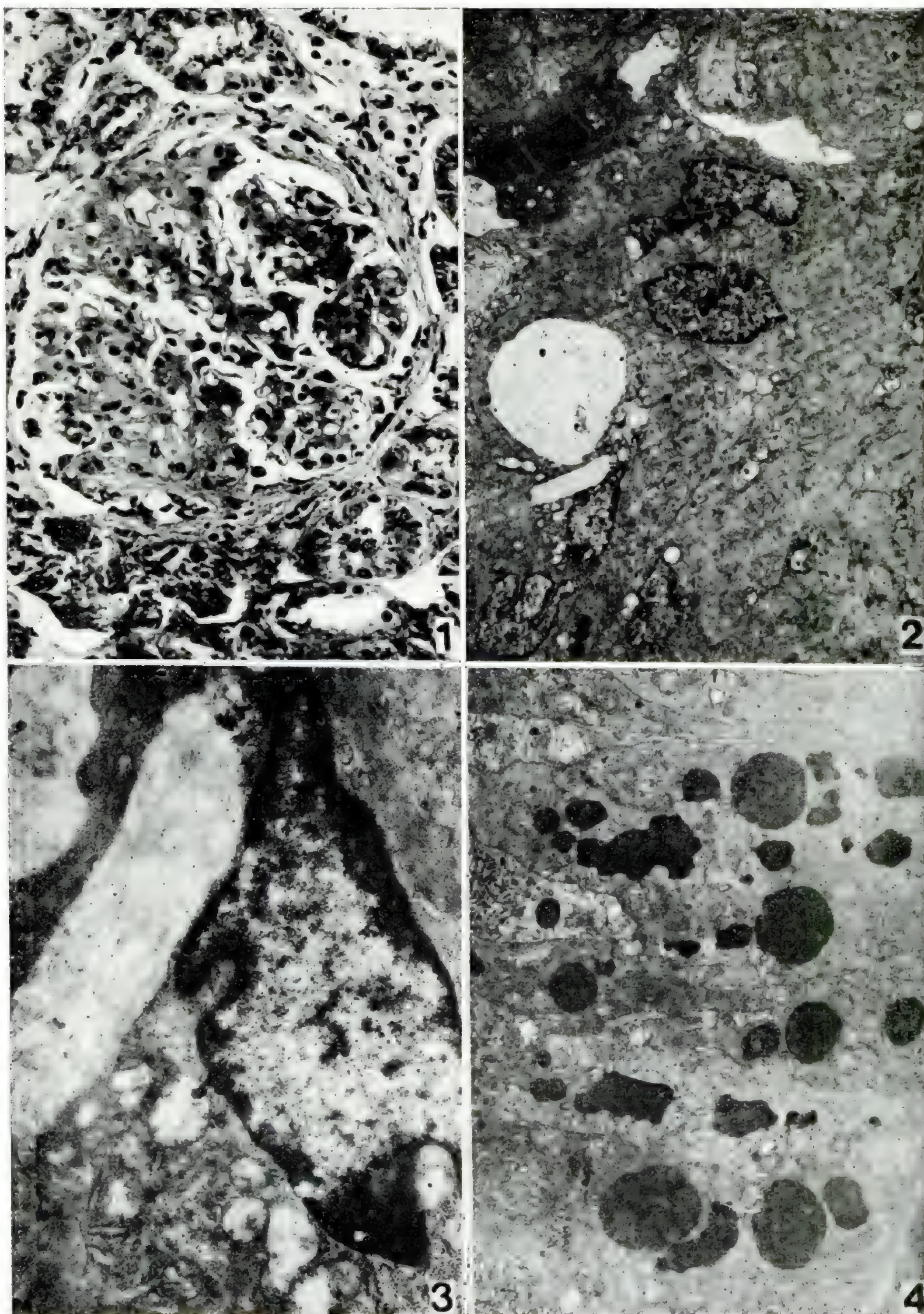
Inmunofluorescencia: Se ven depósitos de IgG, IgA e IgM en todos los glomérulos, con distribución global o segmentaria, de tipo granular en la pared capilar, y de C'3 granulares en la pared capilar y en el mesangio. No se comprobaron depósitos de fibrinógeno.

Microscopía electrónica: Los glomérulos muestran fusión focal y segmentaria de los pedicelos, aumento de la matriz con leve incremento de las células mesangiales y protrusión de la smismas hacia la luz capilar. Se observa disminución de las luces capilares, plegamiento y desdoblamiento de las membranas basales glomerulares. Se visualizaron células de posible origen mesangial, con vacuolas de baja densidad y en forma ocasional células con vacuolas translúcidas o con microtúbulos (cuerpos de Gaucher) de alrededor de 350 Å de diámetro externo (Figs. 2 y 3). Las células de los túbulos contorneados proximales evidencian un notable aumento de los gránulos densos, que en sectores llega a ser llamativo (Fig. 4); lo mismo ocurre con menor intensidad en las células de los túbulos colectores. Se observan algunas células tubulares atróficas con gránulos de morfología semejante a los de lipofucsina. El tejido intersticial muestra fibrosis, y las células intertubulares de la corteza muestran gránulos densos y formaciones vacuolares homogéneas de débil contenido electron-denso.

Discusión

Las alteraciones más destacables del examen físico en este enfermo fueron el edema generalizado, la hipertensión arterial y la hepatomegalia. Los análisis mostraron un síndrome nefrótico con hipergammaglobulinemia, colesterolemia normal e insuficiencia renal moderada, como puede verse en ocasiones en la amiloidosis renal, en la glomeruloesclerosis intercapilar de la diabetes o en las colagenopatías, enfermedades que no fueron comprobadas en este paciente. Por otro lado, en la EG se ha descripto hipergammaglobulinemia, colesterol normal o descendido [13], los cuales en nuestro caso podrían atribuirse a esta patología.

Es interesante señalar que la infiltración del riñón con las CG es considerada infrecuente y cuando ocurre suele no acompañarse de signos de afectación renal, de acuerdo con los trabajos de Chang-Lo y col. [2] y de Reich y col. [10], quienes las describieron en 2 de 12 y en 1 de 20 casos, respectivamente. En nuestro caso la microscopía de luz mostró una glomerulopatía esclerosante focal acompañada de hipercelularidad y aumento de la matriz mesangial, por lo que resulta difícil ubicarla dentro de las glomerulopatías primarias. Los depósitos de IgG, IgM, IgA y C'3 observados con inmunofluorescencia en la pared capilar y mesangio fueron en general de tipo granular y de intensidad moderada, como los que se suelen ver en enfermedades por inmunicomplejos circulantes, aunque también podrían carecer de significado inmunológico, pudiendo tratarse de un atrapamiento de proteínas en los glomérulos afectados. La microscopía electrónica destacó especialmente el aumento de la matriz y del número de células del mesangio así como la presencia de células con cuerpos de Gaucher [4, 9]. Es interesante recordar que el cerebrósido aislado en esta enfermedad tiene similar morfología ultraestructural que la de los microtúbulos observables en los cuerpos de Gaucher [6, 9]. Estos últimos pueden ser considerados como lisosomas en los que los microtúbulos representan material residual [5, 9]. El incremento observado de los gránulos densos en las células del túbulo proximal, se debería a la proteinuria y a la reabsorción aumentada de proteínas plasmáticas a ese nivel; sin embargo, en otras nefropatías estudiadas por nosotros con proteinurias de similar magnitud, no se los reconoció con esta intensidad, lo que hace difícil admitir esta explicación como único factor causal [8]. Dado que la EG es una alteración lisosómica [5], podría ser que esté condicionando esta respuesta particular frente a la proteinuria, ya que es bien conocido que los gránulos densos corresponden a lisosomas [7]. La morfología óptica y electrónica descarta la amiloidosis, la esclerosis glomerular focal y segmentaria o la focal



Figs. **1-4.** — **1,** Lobulación glomerular, aumento de matriz y celularidad mesangial, adherencias y engrosamiento de la pared capilar. Se observan algunas células de citoplasma vacuolar; Tricrómico de Masson 350 x. **2,** Glomérulo: aumento de matriz y celularidad mesangial. Formaciones vacuolares translúcidas y con microtúbulos; 4500 x; **3,** Glomérulo: vacuola translúcida con microtúbulos; 21 000 x; **4,** Tubo contorneado proximal: aumento de gránulos densos, algunos con forma bizarra; 7500 x.

y global, por lo tanto la glomerulopatía de este caso podría atribuirse a la EG. A favor de esta suposición referimos el estudio de De Brito y col.[3], en el cual se presenta un enfermo muy semejante al nuestro, desde el punto de vista clínico e histopatológico, con la diferencia de que estos autores no observaron depósitos glomerulares de inmunoglobulinas y complemento, y encuentran depósitos intramembranosos en el estudio ultraestructural. Más recientemente se comunicaron dos nuevos casos de esta tesaurismosis[1, 12] con CG en el riñón y lesiones de esclerosis glomerular y proliferación mesangial. Asimismo encuentran en la inmunofluorescencia a nivel de la pared capilar reacción positiva para IgA e IgM, y con el microscopio electrónico depósitos intramembranosos[12]. Chander y col.[1] relacionan el compromiso renal de su enfermo a la esplenectomía realizada, sospechando una relación de causa a efecto. Estas observaciones sugerirían que la EG puede a nivel renal presentarse ya sea con una infiltración por sus células típicas[2, 10, 11], y ocasionalmente agregarse una glomerulopatía esclerosante y mesangioproliferativa.

ADDENDUM: La insuficiencia renal progresó en los 15 meses siguientes y el 25-VIII-79 el paciente comenzó el tratamiento con hemodiálisis crónica.

Resumen

Se presenta una nefropatía en un caso de enfermedad de Gaucher (confirmada por el estudio histopatológico del bazo). La enfermedad renal se presentó con un síndrome nefrótico con hipergammaglobulinemia, colesterol normal, hipertensión arterial e insuficiencia renal crónica. Se le practicó una biopsia renal a cielo abierto que fue estudiada por microscopía óptica, inmunofluorescencia y microscopía electrónica. Con la microscopía óptica se observó una glomerulopatía esclerosante focal, acompañada de proliferación mesangial y aumento matricial, engrosamiento focal y segmentario de la pared capilar, focos de fibrosis intersticial y atrofia tubular en relación con estos últimos; los túbulos contorneados proximales mostraron imágenes granulohialinas abundantes. Esta glomerulopatía resultó difícil de ubicar dentro de las clasificaciones basadas en las alteraciones histológicas. La inmunofluorescencia mostró depósitos de IgG, IgA e IgM en la pared capilar, además de C'3 en la pared capilar y mesangio, como los existentes en enfermedades por inmunocomplejos circulantes. La microscopía electrónica permitió observar en los glomérulos fusión focal y segmentaria de los pedicelos, aumento de la celularidad y matriz mesangial, desdoblamiento de la membrana basal y células con cuerpos de Gaucher, y en los túbulos proximales aumento de gránulos densos. Estos hallazgos permiten eliminar a la amiloidosis, a la esclerosis glomerular focal ya sea segmentaria o global, como responsables de la nefropatía. En los últimos años se han comunicado enfermos con esta tesaurismosis y compromiso renal muy semejante al de nuestro caso. Se concluye que la enfermedad de Gaucher puede caracterizarse por la presencia de sus células típicas en el riñón sin dar manifestaciones clínicas renales; sin embargo, puede presentarse con proteinuria, hipertensión arterial e insuficiencia renal progresiva asociadas al aumento de la matriz y celularidad mesangiales y a las lesiones de glomeruloesclerosis.

Summary

GAUCHER'S DISEASE AND GLOMERULOPATHY WITH NEPHROTIC SYNDROME.

We refer this case of a patient affected by Gaucher's disease (confirmed through histopathological study of the spleen) who also presented a nephropathy. Renal disease appeared as a nephrotic syndrome accompanied by hypergammaglobulinemia, normal cholesterol, arterial hypertension and chronic renal failure. A surgical renal biopsy was performed and studied by light microscopy, immunofluorescence and electron microscopy. Through light microscopy a focal sclerotic glomerulopathy was observed, together with mesangial cell proliferation and matrix increase, focal and segmental thickening of the capillary wall with focal interstitial fibrosis and tubular atrophy; the proximal convoluted tubules showed abundant hyalin

granules. These glomerular changes were difficult to classify within the usually accepted types of glomerulopathies. By immunofluorescence IgG, IgA, IgM and C'3 deposits appeared in the capillary wall and only C'3 in the mesangium. Electron microscopy of the glomeruli showed cells with Gaucher's bodies, segmental and focal fusion of pedicles, cellularity and mesangial matrix increase and doubling of the basement membrane; in proximal tubules there was an increase of dense granules. These findings exclude amyloidosis and focal glomerular either segmental or global sclerosis as responsible for the nephropathy. During the last few years, observations of this tesaurysmosis associated with renal involvement similar to our patient's have been reported. We conclude that Gaucher's disease could often show typical cells in the kidney without any clinical symptoms; however, a mesangyoproliferative and sclerotic glomerulopathy with proteinuria, arterial hypertension and progressive renal failure could occasionally occur in Gaucher's disease.

Bibliografía

1. Chander PN, Nurse HM, Pirani CL: Renal involvement in adult Gaucher's disease after splenectomy. *Arch Path Lab Med* 103: 440, 1979.
2. Chang-Lo M, Yam LT, Rubenstone AI: Gaucher's disease. Review of the literature and report of twelve new cases. *Am J Med Sci* 254: 303, 1967.
3. De Brito T, Gomes Dos Reis V, Penna DO, Camargo ME: Glomerular involvement in Gaucher's disease. Light, immunofluorescent, and ultrastructural study based on kidney biopsy specimens. *Arch Pathol* 95: 1, 1973.
4. Fisher ER, Reidborn H: Gaucher's disease: Pathogenetic considerations based on electron microscopic and histochemical observations. *Am. J Pathol* 41: 679, 1962.
5. Hers HG, Van Hoof F: Genetic abnormalities of lysosomes. *In:* Lysosomes in Biology and Pathology, JT Dingle y HB Fell, eds. North Holland Pub. Co., Amsterdam, 1969, Vol. II, p 19.
6. Lee RE, Balcerzak SP, Westerman MP: Gaucher's disease. A morphologic study and measurements of iron metabolism. *Am J Med* 42: 891, 1967.
7. Maunsbach AB: Functions of lysosomes in kidney cells. *In:* Lysosomes in Biology and Pathology, JT Dingle y HB Fell, eds. North Holland Pub. Co., Amsterdam, 1969, Vol. I, p 115.
8. Nadal MA, Iotti RM, Monserrat AJ, Gotlieb D, Baldi EM: Síndrome nefrótico de la preeclampsia. *Medicina (Bs Aires)* 39: 65, 1979.
9. Pennelli N, Scaravilli F, Zacchelo F: The morphogenesis of Gaucher's cells investigated by electron microscopy. *Blood* 34: 331, 1969.
10. Reich C, Siefe M, Kessler BJ: Gaucher's disease: A review, and discussion of 20 cases. *Medicine* 30: 1, 1951.
11. Ross L: Gaucher's cells in Kidney Glomeruli. *Arch Path* 87: 164, 1969.
12. Smith RR, Hutchins GM, Sack GH, Ridolfi RL: Unusual cardiac, renal and pulmonary involvement in Gaucher's disease. *Am J Med* 65: 352, 1978.
13. Zlotnick A, Groen JJ: Observations on a patient with Gaucher's disease. *Am J Med* 30: 637, 1961.

— — — —

In science one always strives for simplicity, which is the elegance of proof: Simplex sigillium veri.

En la ciencia uno siempre busca lo sencillo, que es la elegancia del experimento: *Simplex sigillium veri.*

CHARLES B. HUGGINS

Experimental Leukemia and Mammary Cancer,
The University of Chicago Press, 1979

ISSN 0025-7680

Medicina (Buenos Aires) 41: 214-218 (1981)

TYPE I STRIATED MUSCULAR FIBER HYPOTROPHY WITH CENTRAL NUCLEI

ANA LIA TARATUTO, A. L. DUBROVSKY, M. FORTUNATO

Servicio de Neurocirugía, Sección Neuropatología y Neurología, Hospital de Niños, Fundación para la lucha contra las Enfermedades Nerviosas en la Infancia (FLENI) y Sección de Enfermedades Neuromusculares, Hospital Francés, Buenos Aires

Floppy infant syndrome can be the clinical manifestation of several neuromuscular disorders of which the so-called myotubular myopathy, first described by Spiro et al in 1966 [15], has received special attention [10, 11, 37]. Many cases of myotubular myopathy have been reported in the literature under different names, such as centronuclear myopathy [3, 11–14] pericentronuclear myopathy [3] type I fiber hypotrophy with central nuclei [1, 2, 6, 8]. Clinical signs of the disease do not vary excessively and in many cases include ptosis or ophthalmoparesis [3, 4, 7, 10, 11, 14, 15]. We report a case of selective type I fiber hypotrophy with central nuclei without ocular involvement.

Case report

The patient was a seven year old boy. Gestation was normal, but there was some birth hypoxia. He started to walk at the age of two, with frequent falls. Clinical examination at that time revealed hypotonia, a decrease in spontaneous movements of all four limbs, weakness of the neck muscles and hypoactive deep tendon reflexes. The parents brought the child again to the hospital when he was seven years old. At that time the examination showed a bright, alert child with proximal weakness and a positive Gowers sign. There was mild muscle wasting in proximal and distal muscles of the lower limbs and winging of the scapullae, lumbar lordosis was enhanced. Weakness of the neck muscles resulted in impairment of lateral movements of the head. Ocular movements were normal and there was no lid ptosis. Deep tendon reflexes were hypoactive. CPK was 35 mU/ml; aldolase 0.5 mU/ml and LDH 140 mU/ml. The EMG showed few fibrillations at rest in the left biceps. During voluntary activity motor unit potentials (MUP) of small amplitude and short duration were detected. An interference pattern was observed during maximal effort. Nerve conduction velocity was in the normal range.

Muscle biopsy

Histological and histochemical methods.

Light microscopy: A specimen for paraffin embedding was fixed in neutral formalin and stained with hematoxylin and eosin, periodic acid Schiff, and Gomori trichrome. A fresh muscle specimen for histochemistry was frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen, and 2 to 10 micron serial sections were cut in a cryostat and stained by the following techniques: hematoxylin-eosin, periodic acid Schiff, modified Gomori trichrome, oil Red O, reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase (NADH), routine AtPase at pH 9.4. *Electronmicroscopy:* The specimen was fixed in cold 2 percent glutaraldehyde buffered with phosphate, for 3 hours, then rinsed in Millonig's buffer, post-fixed in 2 % buffered osmiun tetroxide, dehydrated and embedded in Epon. One micron sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and were examined in a Siemens Elmiskop 101 electron microscope.

Results

In cross section, muscle biopsy showed variation in fiber size within the fascicle (Fig. 1). Type I fibers represented 86 %

Received: 29-X-1980. Accepted: 19-XI-1980.

Postal address: FLENI, Ayacucho 2166, 1119 Buenos Aires, Argentina.

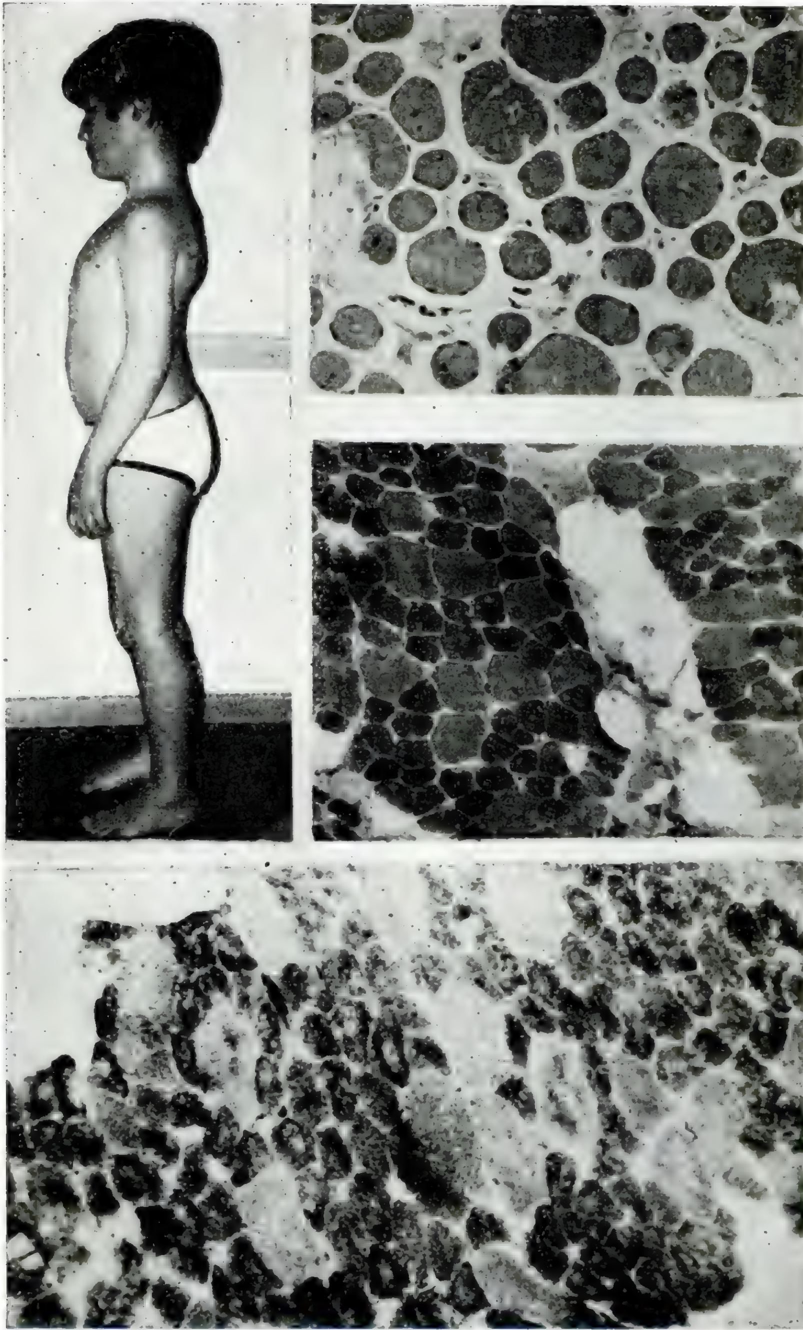


Fig. 1. — **Top left:** patient; **Top right:** Variation of liber sizes. Central located nuclei (Paraffin embedded. HE) x 200; **Center:** Type I hypotrophy. Non specific esterase x 150; Bottom: Type I hypotrophy. Some of the fibers have pale central areas corresponding to the location of the nuclei DPNH x 200.

of the total with an average diameter of 18 μm. Type II fibers with an average diameter of 40 μm, represented 14 % of the total. Central nuclei were present in 85 % of type I fibers. NADH staining showed a small clear area devoid of enzymatic activity corresponding to the location of the nuclei. Myotube-like fibers were not ob-

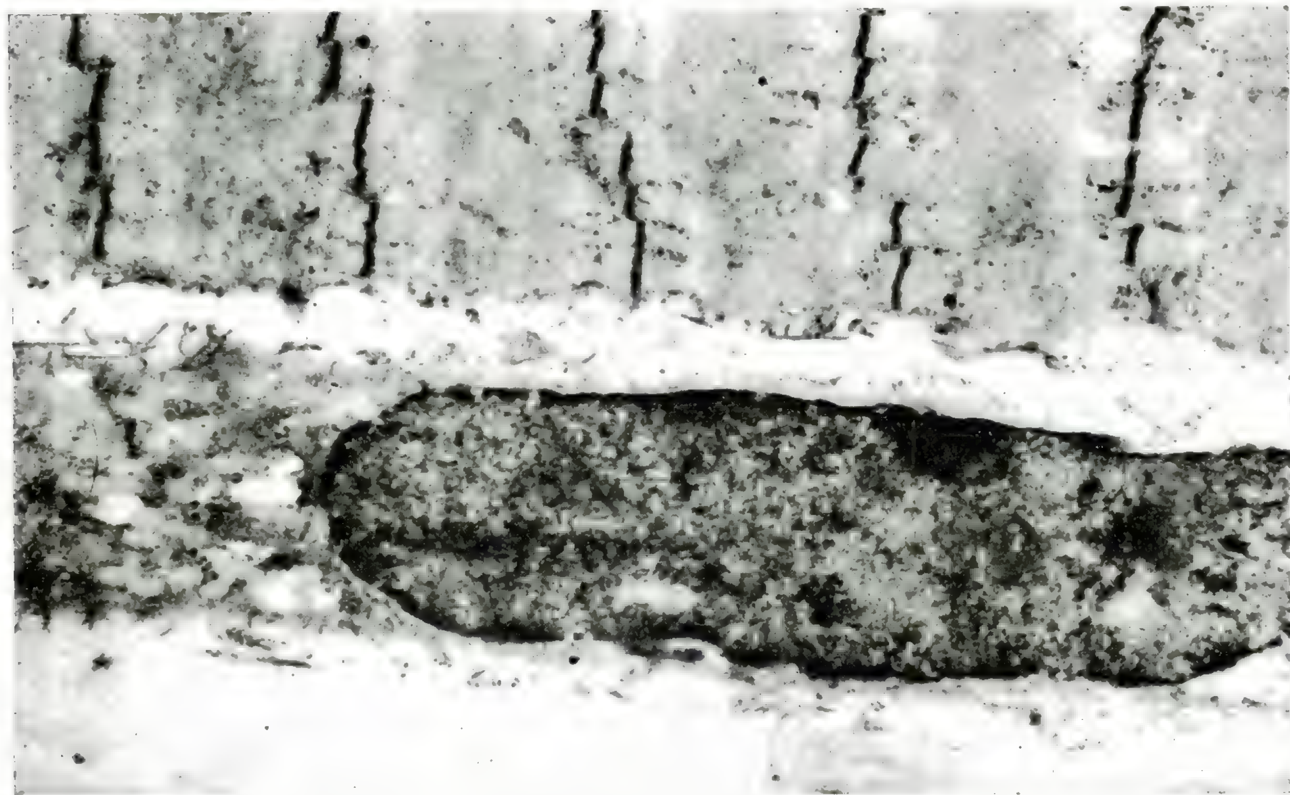


Fig. 2. — Normal fiber and hypotrophic muscle fiber with central nuclei EM x 15.000

served. No degenerated or regenerated fibers, endomysial fibrosis or inflammatory infiltration were present.

The electronmicroscopy disclosed central located nuclei in hypotrophic fibers. Slight dilatation of the sarcoplasmic reticulum and increased glycogen were observed close to the nuclei. No other structural abnormality was observed (Fig. 2).

Discussion

Since Spiro et al described in 1966 [5] the first case of the so-called "myotubular myopathy", there have been several reports in the literature differing in the description of the structural abnormalities of the muscle fibers. These different descriptions led to different names for the disease. Some of the papers lacking histochemical studies reported fibers of small diameter with nuclei located in central position, with or without a central perinuclear area, devoid of myofibrils [3, 13, 15]. Since Engel's paper in 1968 [6] selective type involvement was considered a hallmark of the disease.

During foetal maturation, a myotube is formed by the fusion of the myoblasts. At this stage, between 6 and 10 weeks, a clear central area appears devoid of myofibrils, with nuclei in central position. Later on, between 10 and 15 weeks, the development of myofibrils increases and the clear central area becomes smaller while the nuclei migrate to the periphery in a subsarcolemmal position. Histochemistry shows no clear differentiation of fiber types. Individual myotubes show PAS positive material and increase in lipid granules in the central zone. Oxidative enzyme staining fails to demonstrate any activity. The designation of myotubular for this congenital neuromuscular disorder is the result of the resemblance with the embryonic myotubes. There are different interpretations of the abnormal myotube-like fibers, specially regarding the clear central area surrounding the nuclei.

In our opinion, which agrees with that of other authors, the findings within the muscle fibers could be explained in two different ways:

1. Real clear central zone: in this case, there is a lack of myofibrillar material in the central area of the muscle fiber, yielding a picture closely resembling the foetal myotube.

2. Artificial clear area: if the section is taken across the nuclei, the clear central area devoid of enzymatic activity would appear simply because of the presence of the nuclei in this area, in spite of a normal density of myofibrils.

If the disease is the result of an arrested maturation of the myofibers, it is highly possible, that many different stages of maturation occur simultaneously in the muscle biopsy. This could explain the heterogeneity of the percentage of the fibers showing myotubes and/or central nuclei in the same biopsy, as described in the reported cases.

Many lines of evidence indicate that the pathogenesis of the disease is neurogenic rather than myopathic.

Trophic influence of the motor neurons on muscle, has been largely demonstrated on clinical and experimental grounds, although no biochemical substance responsible for these effects has been found.

Any neuromuscular disease which presents selective type involvement, can be interpreted as probably neurogenic in origin. This is true for many diseases secondary to systemic or other primary mechanisms or drugs, as is the case for selective type II hypotrophy that can be seen in steroid therapy, myasthenia gravis, disuse or in malignancy. These other primary diseases or mechanisms could be selectively affecting type II motoneurones. We have recently reported a case of selective type II hypotrophy of clear neurogenic origin (proved by the presence of type grouping with persistence of small hypotrophic type II fibers within the groups in a second biopsy [5]). Neuropathy is almost always expressed as a disease with structural abnormalities in the motor neuron, its axon or myelin sheath. These abnormalities are expressed by altered electrophysiological response.

It is possible that an extrinsic or intrinsic metabolic defect of the motor neurone could be expressed as a lack of trophic influence on the myofibers which could result in the persistence of "myotube-like" fibers or hypotrophy or cores, rods, etc. This still should be called neuropathy. Selective type hypotrophy has been to some extent reproduced experimentally (in type II fibers) by neonatal neurectomy in rats [6]. This experiment supports the hypothesis of deficient neuronal influence producing a reduction in the size of the fiber (neuropathic mechanism). On clinical grounds, the reported cases share many signs and characteristics such as congenital hypotonia, arreflexia, generalized weakness and neck muscle involvement. Extraocular muscle involvement and facial diplegia have been reported in about half of the cases. Coincidentely, myotonic atrophy also characterized by type I atrophy, ophtalmoplegias (Kearns Sayre, sporadics) and oculopharyngeal "dystrophy" both affecting mainly type I fibers, show lid ptosis as a common clinical feature.

The patient's EMG showed brief, small, abundant poliphasic potentials during voluntary effort. This was commonly regarded as the "myopathic pattern" and somehow reinforced the idea of a myopathic mechanism for the disease.

In agreement with other authors, we do not regard this type of EMG pattern as myopathic. Brief small potentials are also recognized in neuropathies. "Myopathic" EMG in this case implies a myopathic pathogenesis for a disease when this is far from proven.

The present report is a sporadic case. Genetic heterogeneity results from all the reported cases.

Differences in genetic, clinical and some histopathological features, suggest that there may be many variants of the same pathological condition.

Summary

Infantile hypotonia is frequently secondary to neuromuscular disorders. Type I hypotrophy with central nuclei is one of the congenital neuromuscular diseases. A 7½ year old male patient with a history of hypotonia and delay motor milestones suffering from this condition is reported. EMG showed small, brief amplitude potentials. Muscle biopsy disclosed type I hypotrophy with a high percentage of central nuclei. A type I fiber maturation defect, secondary to lack of metabolic or trophic influence affecting type I motorneuron could be the pathogenic mechanism. Central areas devoid of enzymatic activity can be explained as the trans-

verse section of the central nuclei or as the result of different maturational states of the muscle fibers at time of biopsy. Genetical heterogeneity as well as difference in clinical and histopathological features suggest the possibility of many variants of the same entity.

Resumen

HIPOTROFIA DE FIBRAS MUSCULARES ESTRIADAS TIPO I CON NÚCLEOS CENTRALES.

Las enfermedades neuromusculares son frecuente causa de hipotonía en la infancia. Entre las enfermedades neuromusculares congénitas, se destaca la hipotrofia tipo I con núcleos centrales. Se presenta un paciente de 7½ años, con una historia de hipotonía y retardo motor, afectado de esta enfermedad. El EMG reveló potenciales de corta duración. La biopsia muscular demostró la presencia de hipotrofia de fibras tipo I con un alto porcentaje de núcleos centrales. Un defecto en la maduración de las fibras tipo I secundario a un déficit metabólico o trófico de las motoneuronas tipo I, podría ser el mecanismo patogénico. La presencia o ausencia de áreas claras centrales alrededor de los núcleos podría explicarse por la incidencia del corte y por el estado madurativo de la fibra en el momento de la biopsia. La heterogeneidad genética, clínica e incluso histopatológica de los casos de la literatura sugieren la posibilidad de que existan muchas variantes de la misma entidad.

References

1. Bethlem J, Van Wyngaarden GK, Meijer AEF, Hulsmann WC: Neuromuscular disease with type I fiber atrophy, Central nuclei and myotube-like structures. *Neurol (Minneap)* 19: 705, 1969.
2. Besone MH, Williamson T: An adult case type I nuclei fiber hypotrophy: An abnormality of monosynaptic reflex function. *Neurol* 19: 280, 1969.
3. Campbell MS, Rebeiz JJ, Walton JN: Myotubular, centronuclear or peri-centronuclear myopathy? *J Neurol Sci* 8: 425, 1969.
4. Coleman RF, Thompson LR, Niehuis AW, Munsat TL, Pearson CM: Histochemical investigation of myotubular myopathy. *Arch Pathol* 86: 365, 1968.
5. Dubrovsky AL, Taratuto AL, Martino R: Distal spinal muscular atrophy and ophtalmo-paresis. *Arch Neurol* (en prensa).
6. Engel WK, Gold GN, Karpati G: Type I fiber hypotrophy and central nuclei. *Arch Neurol* 18: 435, 1968.
7. Hawkes CH, Absolon MJ: Myotubular myopathy associated with cataract and electrical myotonia. *J Neurol Neurosurg and Psychiat* 38: 761, 1975.
8. Inokuchi T, Umezak H, Santa T: A case of type I muscle fiber hypotrophy and internal nuclei. *J Neurol Neurosurg and Psychiat* 38: 475, 1975.
9. Karpati G, Carpenter S, Nelson RF: Type I muscle atrophy and central nuclei. *J Neurol Sci* 10: 489, 1970.
10. Kinoshita M, Cadman TE: Myotubular myopathy. *Arch Neurol* 18: 265, 1968.
11. Munsat TL, Thompson CR, Coleman RF: Centronuclear (Myotubular) myopathy. *Arch Neurol* 20: 120, 1969.
12. Serratrice G, Pellissier JF, Faugere MC, Gastaut JL: Centronuclear myopathy: Possible central nervous system origin. *Muscle and Nerve* 1: 62, 1978.
13. Schochet SS, Zellweger H, Ionasescu V, Mc Cormick WF: Centronuclear myopathy: Disease entity or a syndrome? *J Neurol Sci* 16: 215, 1972.
14. Sher JH, Rimalovski AB, Athanassides TJ, Aronson SM: Familiar centronuclear myopathy. A clinical and pathological study. *Neurol* 17: 727, 1967.
15. Spiro AJ, Shy GM, Gonatas NK: Myotubular myopathy. *Arch Neurol* 14: 1, 1966.

 ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 219-227 (1981)

ADENOCARCINOMA DE COLON, CIRROSIS, ALTERACIONES DE LA COAGULACION Y HEMORRAGIA DIGESTIVA

J. G., 74 años, sexo masculino. H. C. 51 923. Autopsia Nº 2213. Ingresó 24-VII-78. Falleció 9-IX-78.

Su enfermedad actual comienza 1 mes antes de su internación, con astenia, anorexia, adinamia y disnea de esfuerzo. Se le realizan diversos análisis de laboratorio, encontrándose anemia, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia e hipocolesterolemia. Refiere, además, cambios en el ritmo evacuatorio intestinal (constipación desde hace 1 año) y distensión abdominal post-prandial.

A su ingreso impresiona como moderadamente enfermo, lúcido, afebril, edema sacro +/6, dermatitis ocre y pigmentaria en miembros inferiores. Trombos venosos palpables en venas superficiales de miembros inferiores. Roncus y estertores crepitantes en ambas bases. Auscultación cardíaca sp. Pulso 96 x min. Presión arterial 120/80. Abdomen blando y depresible. Dolor a la palpación en epigastrio e hipocondrio derecho. El hígado se palpa a un través de dedo por debajo del reborde costal; no se palpa bazo ni riñones. Hiporreflexia patelar y aquiliana. Como antecedentes personales, 30 años antes le diagnosticaron diabetes mellitus, siendo tratado con dieta. No fuma. Cuatro meses antes de su internación tiene tos con expectoración mucosa, que remite con antibióticos. Hace 6 meses, palpitaciones, por cuyo motivo fue digitalizado con Digoxina (0.25 mg) por día. 25-VII: hematocrito 31 %, glóbulos blancos 4300 (N 80, E 1, B 2, M 2, L 14); VSG 130 mm en la primera hora; VDRL (—); ácido úrico 8.2 mg %. Sedimento urinario normal, glucemia 1.05 g %, Na 129 mEq/l, kalemia 4.9 mEq/l; urea 0.20 g ‰; Bilirrubina total 2 mg %; Bilirrubina directa 0.80 mg %; Colesterol 72 mg %; fosfatasa alcalina 145 mU/ml; GOT 8 mU/ml; GPT 9 mU/ml; LDH 110 mU/ml; albúmina 2.33 g %; globulinas 4.87 g % (α_1 0.39, α_2 0.47, β 0.52 y γ 3.49 g %). Estudio de coagulación: Quick 32 %; PTTK 72 seg; fibrinógeno 850 mg %; F. II 13.5 %; F. VII-X 15 %; F. V 44 %; F. VIII 9.2 %; plaquetas, cantidad normal, aisladas. LDF 7.68 mg/ml; látex (+) 1/160; calcio 8.8 mg %; P 3.25 mg %; creatinina 0.81 mg %/ ferremia 37 γ %; TIBC 243 γ %; saturación de siderofilina 15 %; reticulocitos 1.6 %; sangre oculta en materia fecal (+). Punción aspiración de médula ósea y biopsia ósea con aguja de Jamshidi: hipoplasia eritroblástica y aumento de células reticulares, linforreticulares, núcleos libres y células plasmáticas. Hierro de depósito: muy disminuido. Radiografía de tórax: atelectasias laminares bilaterales. Radiografía de columna: osteoporosis generalizada. Colon por enema: estenosis en ángulo hepático compatible con carcinoma de colon. Seriada gastroduodenal: normal. Electrocardiograma: taquicardia sinusual; hipertrofia ventricular izquierda, hemibloqueo anterior izquierdo. Centellograma hepático: compatible con cirrosis hepática. Durante la internación se administran 20 mg de vitamina K y transfusiones de plasma fresco sin corrección de las alteraciones de coagulación. Se indicó 15 000 U de heparina por vía subcutánea por día y en un nuevo control el Quick es de 64 %, con un PTTK de 50.8 seg. El 28-VIII es laparotomizado, comprobándose la presencia de líquido ascítico en peritoneo y un hígado cirrótico, macro y micronodular. En el ángulo hepático del colon se encuentra una tumoración, no observándose adenomegalias, ni metástasis. Se realiza resección segmentaria del colon con anastomosis término terminal, con desgarro de vena peripancreática y control dificultoso de la hemostasia. Informe anatomopatológico: adenocarcinoma vegetante mucosecretante de ángulo hepático de colon con invasión hasta serosa (Dukes tipo C_1). Tres ganglios regionales, uno con metástasis. En el tercer día del postoperatorio está deshidratado, manteniendo una buena diuresis. Hto. 36 %; leucocitos 11 300 (C 3 Seg N 86, E 1, B 0, M 6, L 5); VSG 26 mm; urea 0.30 g %; Na 127 mEq/l; K 5.3 mEq/l; Quick 36 %; PTTK 79 seg F. II 28.5 %; F. VII-X 24.5 %; F. VIII 98 %; F. V 45 %. Plaquetas en límite inferior normal, tendencia aislada, algunas megaplaquetas. Se suspende la heparina. El día 4-IX está oligúrico, distendido, con escasos ruidos hidroaéreos en abdomen, se coloca sonda nasogástrica. El 6-IX presenta una hemorragia digestiva alta, es transfundido con 4 unidades de glóbulos F, se realiza esofagogastroscopía, constatándose una úlcera en

— — — —

Reunión anatomoclínica efectuada en el Instituto de Investigaciones Médicas del 23-V-80. Editores: Dres. M. A. Castro Ríos y H. J. Delisio.

tercio medio de esófago. El 8-IX continúa con hematemesis, y recibe 6 unidades de sangre. Quick 48 %; PTTK 48 seg; F II 24 %; F VII y X 25 %; P y P 10 %; F VIII 90 %; F IX 60 %; F XI 56 %; fibrinógeno 200 mg %; albúmina 2.47 g %; globulinas 3.15 g %; ácido úrico 11.4 mg %; hipotensión arterial (60/30); pulso filiforme. Posteriormente presenta depresión respiratoria, falleciendo a las 7.30 horas.

Discusión clínica

Dr. A. Arata: Es un paciente de sesenta y cuatro años que consulta por aparición brusca de edemas en los miembros inferiores. Además presentaba como signos clínicos de importancia la existencia de adinamia, de astenia y constipación de un año de evolución. Simultáneamente, los datos de laboratorio fueron realmente muy interesantes, dado que permitían hacer algún tipo de disquisiciones junto con la sintomatología clínica. Ellos mostraban que tenía una marcada hipergamaglobulinemia, colesterol bajo y alteraciones francas de la coagulación. En la sala se pensó en la existencia de un mieloma, dado que tenía gamaglobulina muy alta y esto fue descartado en el momento que la inmunoelectroforesis demostró que la gamaglobulina era de tipo policlonal y no monoclonal. Uno debería pensar qué enfermedades son capaces de dar hepatomegalia, alteraciones severas de la coagulación e hipergamaglobulinemia. Claro, no resulta entonces descabellado pensar en la existencia de una hepatopatía crónica, responsable de los fenómenos inmunológicos que tenía el paciente. Que las enfermedades agudas del hígado, como es la hepatitis viral aguda, tienen alteraciones inmunológicas e hipergamaglobulemia es bien conocido. Presentan un aumento marcado de IgM pero esto es transitorio, llegan a durar entre dos a tres semanas y esto luego desaparece; a tal punto que cuando se encuentra que la gamaglobulina persiste elevada, uno empieza a sospechar si no está evolucionando hacia una lesión crónica del hígado. La otra causa sería que el paciente tuviera una enfermedad crónica del hígado. Desde el punto de vista inmunológico él tenía una elevación de IgG con IgA conservada o muy poco aumentada e IgM también muy poco aumentada. En general, en las enfermedades crónicas del hígado donde uno encuentra este patrón es sobre todo en la cirrosis post-necrótica o en la cirrosis llamada también post-hepatítica o criptogenética. Dado que esto lo diferencia bastante claramente de la inmunología que se puede encontrar en la cirrosis alcohólica en la cual si bien uno puede encontrar hipergama en una cirrosis septal, ésta es de poca magnitud, nunca alcanza los valores hallados en la post-necrótica y también el patrón a veces es diferente. En la alcohólica el aumento sobre todo es a expensas de IgA y no de IgG como es en este paciente. Quizás pudiera acercarse por los datos de laboratorio al diagnóstico de lesión hepática pensando que podría ser una hepatopatía crónica del tipo de una cirrosis post-hepatítica o post-necrótica. También la existencia de un látex positivo está a favor dado que se han podido comprobar depósitos de una macroglobulina 19 S incluso en las células plasmocitarias y linfáticas que infiltran los septos en estos pacientes; o sea que por un lado, uno podría hacer instantáneamente el diagnóstico de cirrosis post-necrótica. Existía una cosa interesante que es el trastorno grave de coagulación que tenía este paciente. Si bien en una hepatopatía crónica es común la caída del factor II, del factor V, del factor VII, del IX y del X, llamaba la atención la existencia de un factor VIII disminuido. Claro, si uno supone que el factor VIII es producido por el sistema retículo endotelial, y no solamente por el hígado, evidentemente tiene que haber otra causa fuera de la hepatopatía capaz de producir un factor VIII bajo. Esto fue transitorio, luego creo que lo corrige por momentos, y también se asociaba la existencia de un fibrinógeno alto por momentos, hallazgo no demasiado común en las cirrosis. Es decir, el fibrinógeno en la cirrosis puede estar normal o disminuido; encontrarlo en esos niveles era francamente llamativo. Se podría quizá explicar en parte el descenso del factor VIII por la existencia de un consumo crónico y uno puede pensar ¿por qué puede tener un consumo crónico? El paciente se quejaba desde hacía un año de constipación persistente, y el estudio ra-

diológico que se hizo en el Instituto mostró la existencia de un tumor en el ángulo hepático del colon. Cuando fue explorado se comprobó que era un adenocarcinoma mucosecretante que aparentemente invadía hasta la muscular y epiplón. ¿Cuál fue la causa de la muerte? Aparentemente el tumor estaba localizado, no estaba diseminado y sí había una hepatopatía grave con trastornos severos de la coagulación. En el post operatorio comienza a sangrar en el tercio medio del esófago, aparentemente por una úlcera provocada por la sonda nasogástrica; ésta se retiró pero, evidentemente, la magnitud de la hemorragia fue muy importante y yo creo que murió en hipovolemia, sangrando por los trastornos graves de coagulación, más la lesión provocada por la sonda o sea que, la sala va a seguir asumiendo su diagnóstico de cirrosis post-hepatítica, adenocarcinoma de colon y muerte por hemorragia esofágica.

Dr. C. Duncan: En este paciente que al ingresar mostraba una eritrosedimentación muy acelerada y una hipergamaglobulinemia de 5.9 g %, sin estigmas de hepatopatía crónica, creo que era bastante acertado pensar en un mieloma. Luego, para investigar metástasis hepáticas se solicitó un centellograma que reveló las características de la probable cirrosis que cuatro meses antes se manifestara con edemas en miembros inferiores. La confirmación se obtuvo en la operación, de una cirrosis morfológicamente mixta (la forma más habitual). Presentaba graves alteraciones en la coagulación y caída de fibrinógeno a valores como suele verse en las necrosis masivas o en las cirrosis severas. Creo que es interesante decir algo sobre la relación entre cáncer y cirrosis, por la consabida menor presentación de metástasis hepáticas en estos casos y al respecto posiblemente la Dra. Sarano hará algún comentario. Sobre el otro problema, me refiero al cáncer de colon y para beneficio de los alumnos, vale la pena recordar que éste tiene una mayor incidencia en aquellos a los que ya se les ha demostrado anteriormente un carcinoma, se les ha extirpado algún tipo de pólipo o que padecen una colitis ulcerosa. De la misma manera, el hallazgo de este tipo de tumor impone la necesidad de investigar la existencia de otras lesiones mediante técnicas radiológicas especiales o colonoscopía ya que aproximadamente un 40 % de enfermos con un cáncer de colon padece alguna otra patología concomitante (la mayoría de las veces un pólipo), pero en el 20 % de aquel porcentaje (es decir en 8 de cada 100) se podrá reconocer una segunda lesión maligna. En el estudio radiológico con doble contraste, se observa la irregularidad del borde o una falta de relleno que son muy difíciles de interpretar. Como ya lo hemos conversado en otras ocasiones, este examen, que sin discusión debe ser realizado por el médico y no por un técnico, requiere gran atención en el seguimiento paso a paso del bario hasta alcanzar el ciego, con los cambios de posición y maniobras adecuadas al insuflar aire. Es por ello que el doble contraste por enema no debe ser empleado rutinariamente, sino como un segundo examen tras la duda en el convencional o para la búsqueda de determinada patología. La hemorragia, como la causa más frecuente de descompensación hepática, creo que fue la responsable de la muerte en este paciente con un severísimo compromiso de este órgano. Con respecto a la esofagitis, comprobada endoscópicamente, ya comentamos en su oportunidad que la sonda nasogástrica pudiera ser la determinante.

Dr. M. A. Castro Ríos: Este paciente tiene demostrada la presencia de un carcinoma de colon y una cirrosis post-necrótica, por lo tanto, la discusión, debe centrarse en los aspectos clínicos y de laboratorio de su evolución, que valen la pena destacar. En el primer estudio de coagulación realizado, se observa el tiempo de protrombina y el KPTT prolongados. Se administró vitamina K 20 mg, por vía endovenosa, sin poder obtenerse una corrección del tiempo de protrombina; esta falta de respuesta a la vitamina K, nos lleva generalmente, a sospechar de una lesión hepatocelular, y en este caso una hepatopatía crónica como la cirrosis. Los estudios de coagulación, son métodos sencillos de detección de una disminución hepática, y no solamente tienen valor

diagnóstico, sino que también valor pronóstico. En los primeros días de su internación, se detectó que el fibrinógeno estaba aumentado (850 mg%); éste, no es un buen índice para valorar la función hepatocelular, porque recién disminuye sus valores cuando hay una lesión grave del hígado con un cuadro clínico simultáneo, por lo tanto en pacientes con una hepatopatía crónica compensada, los niveles de fibrinógeno pueden estar normales e incluso aumentados, ya que se comporta como un reactante de fase aguda, y está aumentada su síntesis en inflamación, infección y neoplasias, como tenía este paciente. El factor II, también sintetizado en el hígado estaba disminuido, como también el factor VII (15 %), y este último, sí tiene importancia en el pronóstico ya que se ve poco modificado por situaciones como la infección, inflamación, y coagulación intravascular, y esta disminución, junto con la prolongación del tiempo de protrombina nos están indicando que existe una severa lesión hepatocelular. Nos llamó la atención en los primeros estudios, la presencia de un factor VIII disminuido, lo que no es habitual, ni en la literatura, ni en nuestros pacientes estudiados con cirrosis, por ese motivo se efectuaron pruebas para detectar la presencia de un inhibidor circulante de la coagulación, que fueron negativas, por lo que llegamos a la conclusión que tenía además agregado un consumo intravascular crónico, que ha sido descripto en neoplasias y en la enfermedad hepática aguda y crónica. Creo que este paciente presentaba una condición ideal para el desarrollo de coagulación intravascular, que es la asociación de una neoplasia con una cirrosis hepática, siendo el mecanismo de activación de la coagulación por parte de los tumores, la liberación o secreción de mucina o sustancias procoagulantes que actúan a nivel de la activación directa del factor X. Esto probablemente sea potenciado por la cirrosis, ya que se describe la disminución del clearence de factores de coagulación activados, o la disminución de la síntesis de inhibidores de la coagulación como la antitrombina III, la alfa 1 antitripsina y la alfa 2 macro, como también se describe que en las necrosis hepatocelulares pueda producirse la liberación de sustancias tromboplásticas. Durante toda la evolución tuvo plaquetas en cantidad normal y PDF ligeramente positivos que pueden verse en cirrosis por aumento de la fibrinolisis, por lo que el descenso del factor VIII y fundamentalmente la corrección de las alteraciones de coagulación con la administración de heparina, fue lo que nos hizo pensar que probablemente tuviera un consumo crónico. También aquí vale la pena destacar que en general trombocitopenia marcada y valores elevados de PDF se encuentran cuando hay metástasis, lo que sugiere que este paciente no hubiera metastatizado desde su neoplasia colónica. En 106 enfermos con cirrosis estudiados en el IIM, sólo 7 de ellos tuvieron neoplasias asociadas, 5 hepatomas, dos de los cuales tenían asociados otros tumores, un nesidioblastoma y un tumor de células claras: siendo los otros tumores un carcinoma de páncreas y un carcinoma de vesícula biliar; de estos 7 pacientes sólo uno presentaba un estudio de coagulación que pudiera ser compatible con un consumo crónico, ya que presentaba un factor VII normal, acompañado de trombocitopenia y descenso del factor VIII. Es interesante destacar que los 5 pacientes con hepatoma en toda su evolución tuvieron cifras de hemoglobina normal y en forma persistente linfocitopenia y los cinco presentaron valores de hipergamaglobulinemia por encima de 3 g %, con una cifra promedio de 6.5 g %. Con respecto a la eritrosedimentación, que en toda su evolución estuvo muy acelerada, cuatro días después de la operación, la misma bajó rápidamente, y creo que estuvo relacionada al aumento del consumo intravascular por la movilización del tumor, que lleva a la liberación de sustancias tromboplásticas y esto se corrobora con la cifra de fibrinógeno de 200 mg % en el 6º día del postoperatorio y probablemente el descenso en días subsiguientes haya sido mayor. Finalmente el paciente fallece por una hemorragia provocada por el decúbito de una sonda nasogástrica en esófago; durante el desarrollo de la misma se administró ácido epsilonaminocaproico por vía endovenosa, para inhibir la fibrinolisis, pero creo que en este caso

estaba contraindicado por tener un consumo crónico, y que finalmente pueda haber desencadenado una coagulación intravascular diseminada; por otra parte no existían evidencias de laboratorio de que tuviera aumento de la fibrinolisis. En resumen creo que tiene una cirrosis hepática, pienso que no se van a encontrar metástasis luego de la resección de su carcinoma de colon. Probablemente ha desarrollado una sepsis con punto de partida en peritoneo y una peritonitis plástica y que fallece por una hemorragia digestiva por una úlcera esofágica por el decúbito de la sonda, y no sé si se van a encontrar deósitos de fibrina o trombos en microcirculación, que creo estarían relacionados a la acción del ácido epsilonaminocaproico en un paciente con un consumo crónico.

Dr. F. A. Marchetti: El primer hallazgo intraoperatorio en este paciente fue la presencia de gran cantidad de líquido intraperitoneal. Una vez evacuado la totalidad del mismo se comprobó que el parénquima hepático presentaba micronódulos, algunos de ellos con un diámetro aproximado al centímetro, que no revestían la característica de metastásicos. La exploración del abdomen mostró un tumor que estenosaba en forma importante el ángulo derecho del colon, pero fácilmente desplazable, es decir sin adherencias a peritoneo ni a órganos vecinos. La táctica quirúrgica que empleamos en dicho momento fue la de resección segmentaria con anastomosis término-terminal en monoplano, la misma consiste en suturar serosa y muscular solamente sin hacerlo con la mucosa. Este tipo de anastomosis la practicamos por primera vez en el Instituto y en este paciente. Nos llamó la atención un importante aumento del flujo venoso del sistema afluente porta: en una de las maniobras realizadas, una vena peripancreática fue lesionada, y tuvimos dificultad para cohibir la hemorragia debido a la presencia de esta hipertensión venosa. Antes de finalizar quisiera hacer algunas consideraciones de importancia con respencto a la clasificación de tumores de colon a la cual hizo referencia el Dr. Arata, mencionando que este tumor pertenece al tipo C_1 de la clasificación de Dukes, modificada, de adenocarcinoma de colon. Creo que acá existe un error de interpretación de dicha clasificación. Tratando de relacionar las características citológicas de un tumor con su evolución clínica, Broders, en 1926, tomando como referencia trabajos de otros autores, presenta una clasificación de los carcinomas en cuatro grupos de acuerdo al grado de maduración de sus células y de la proporción de mitosis atípicas: Grado I: células dispuestas en tubos glandulares que recordarían la mucosa normal con un 25 % de mitosis atípicas. Grado II: pérdida de la estructura glandular con un 50 % de mitosis para llegar a un 75 % en el grado III y a casi un 100 % en el IV de mitosis atípicas con desaparición total de todo recuerdo glandular. El deseo de establecer una relación anatomoclínica de estos tumores, llevó a otros autores a emitir el concepto de graduación de la malignidad histológica, agregando al aspecto microscópico el macroscópico. Fue así que Lockhart-Mummery (1926) clasificó a los tumores rectosigmoideos en tres tipos: Grupo A: lesión pequeña móvil que no invade la pared intestinal ni ganglios linfáticos. Grupo B: neoformaciones con tendencia a infiltrar la pared intestinal sin fijarla. Grupo C: tumores extensos fijos con evidente invasión de la pared intestinal y de los ganglios linfáticos. Posteriormente Dukes (1932-1940) mejoró esta clasificación separándolo en los siguientes grupos: G.A: tumores generalmente poliposos que quedan limitados a la pared intestinal sin extenderse a los tejidos vecinos. G.B: neoformaciones que infiltran el tejido vecino pero no metasatizan en ganglios regionales. G.C: aquí a las características anteriores se agrega metastasis en ganglios regionales. Este último grupo fue subdividido por Dukes en dos subgrupos: uno en que la metástasis ganglionar queda localizada en la zona peritumoral, y otro en que existen metástasis en los ganglios del grupo mesentérico alejados del tumor. Por lo que este tumor entraría en el Grupo C de dicha clasificación. Con respecto a la hematemesis que fue una de las causas finales de la muerte de este paciente, si bien es cierto que presentaba una úlcera de tercio inferior de esófago por decúbito, yo no dejaría de tener en cuenta la posibilidad de

várices esofágicas, aunque el informe endoscópico no hable de la presencia de las mismas, ni se hayan observado en el acto operatorio. Por último, tendría en cuenta que un 20 a 25 % de pacientes portadores de cirrosis presentan úlcera duodenal, pudiendo ser ésta la causa de la hematemesis final que presentó este paciente.

Dra. F. Molinas: El factor VIII es un complejo molecular cuyas dos actividades mejor conocidas son: la procoagulante (F VIII: C) y el llamado factor von Willebrand (F VIII R: vW). Por otra parte la molécula puede también ser estudiada por métodos inmunológicos (proteína relacionada antigénicamente, F VIII R: Ag). Algunas enzimas como la trombina, las proteasas neutras leucocitarias, etc., pueden a determinadas concentraciones actuar selectivamente sobre el F VIII: C activándolo o degradándolo. Al paciente se le efectuó el estudio del factor VIII y se halló una disociación entre el F VIII: C, cuyo nivel inicial era del 9.2 %, en tanto que el F VIII R: Ag se halló en un 210 %. En un estudio posterior los valores fueron: F VIII: C 150 % y F VIII R: Ag 300 %. La relación normal entre F VIII: C y F VIII R: Ag es de alrededor de 1, en el paciente fue de 22. Estos resultados sugieren dos cosas: 1) la existencia de una enzima que inactiva al F VIII: C y 2) una estimulación de la síntesis del F VIII R: Ag. Pensamos que este fenómeno puede estar relacionado con su neoplasia. La normalización de los factores de la coagulación que el paciente presentó con la administración de heparina hace pensar que la disociación entre el F VIII: C y el F VIII R: Ag se deba a acción trombínica. Con respecto a la activación de la coagulación en la cirrosis, debo decir que no estoy de acuerdo con lo que se acaba de mencionar. Pienso que la coagulación intravascular en la cirrosis es infrecuente. En algunos estudios se halló una disminución de la sobrevida de fibrinógeno y de plasminógeno, lo que avalaría la hipótesis de una activación crónica. Sin embargo, esto no fue verificado por otros. Y es así como se dividen los grupos entre los que creen que en la cirrosis puede haber con frecuencia una activación de la coagulación y otros que afirman que esto es excepcional. En nuestra experiencia en el Instituto no hemos hallado evidencias de activación de la coagulación en estos pacientes.

Dr. E. Bullorsky: Quería comentar que ya desde el año 73 de acuerdo a los trabajos de Fletcher se sabe que en cirrosis hepática existe una disminución de plasminógeno con un gran aumento del proactivador del mismo. Y está descripto que en pacientes con cirrosis a los cuales se los transfunde masivamente se puede desarrollar un mecanismo de fibrinolisis primaria por el hecho de que se le da sustrato o sea plasminógeno en la transfusión al proactivador aumentado. Este enfermo en los últimos tramos de la enfermedad con hemorragia digestiva fue tranfundido en reiteradas oportunidades así que pienso que la indicación de darle epsilonaminocaproico fue por esta razón.

Dr. M. A. Nicastro: Pienso que hay otra razón y es que un cirrótico con activador del plasminógeno aumentado en plasma, pudiera lisar coágulos formados a nivel local en lesiones de tubo digestivo. Quisiera también hacer otro comentario: en pacientes cirróticos con hemorragia digestiva alta, especialmente por várices esofágicas, la existencia de un disfibrinógeno parece afectar enormemente la mortalidad en estos pacientes cuando se compara la evolución del cuadro hemorrágico de cirróticos con y sin disfibrinogenia. Con respecto a la trombocitopenia, se encuentra con poca frecuencia o es moderada en los pacientes con consumo crónico y neoplasias. En realidad hay una eventualidad por la cual estos pacientes pueden tener una severa trombocitopenia e incluso situaciones de cuadros hemorrágicos como este paciente inicialmente presentó y es que se asocie al consumo crónico, metástasis en médula ósea.

Dra. J. Sarano: Desde el punto de vista inmunológico este enfermo tiene dos datos en su historia clínica de interés, que

son la presencia de una hipergamaglobulinemia importante que en su internación fue de hasta 3 g % y un test de látex positivo en títulos de hasta 1/320. Creo que hay que aclarar que la hipergamaglobulinemia que presentaba este paciente era de tipo policlonal ya que en ningún momento se relató la presencia de una banda de paraproteína densa y homogénea en el proteinograma en celogel como suele observarse en las gamopatías monoclonales. En segundo lugar la inmunoelectroforesis mostró que la hipergama era a expensas de un aumento fundamentalmente de IgG, pero sin alteraciones en el arco de precipitación como se observa también en las enfermedades de tipo monoclonal. Además para descartar esta patología el paciente no presentaba cuadro clínico, ni alteraciones en la médula ósea que así lo demostraran, ya que si bien presentaba plasmocitosis estas células eran de morfología normal y la plasmocitosis se halla descripta en los enfermos con cirrosis. Este aumento de las inmunoglobulinas de tipo policlonal es frecuente en las enfermedades del tejido conectivo, en las infecciones crónicas y en la enfermedad crónica del hígado, como presentaba el enfermo en discusión. ¿Por qué estos pacientes con enfermedad crónica del hígado presentan hipergamaglobulinemia de tipo policlonal? Obedecería a una alteración de la respuesta inmune ya que, el hígado juega un rol importante en la regulación de la respuesta inmune ante antígenos exógenos por su capacidad de secuestrarlos y convertirlos en no inmunogénicos. La lesión directa de la célula de Kupffer, la saturación del sistema retículo endotelial del hígado por fagocitosis de gran cantidad de tejido necrótico y el by-pass de la circulación hepática por colaterales como ocurre en la cirrosis determina un fallo en la fagocitosis de estos antígenos con falla en la conversión en no inmunogénicos y un consiguiente aumento de la respuesta inmune. Los antígenos exógenos en exceso que contribuirían a la producción de hipergamaglobulinemia son antígenos absorbidos fundamentalmente por el intestino y antígenos virales que normalmente deberían ser secuestrados por el hígado. También, estos estímulos antigénicos exógenos en exceso, podrían ser un factor desencadenante en la formación de auto anticuerpos en algunas de las enfermedades hepáticas. Esto se vio en estimulación en ratas, con hiperinmunización con bacterias o virus y que posteriormente se pudo encontrar en ellas autoanticuerpos que se determinaron como anti-ADN. También las alteraciones en la función de las células de Kuppfer puede jugar un rol en la aparición de inmuno complejos circulantes, ya que la formación de inmuno complejos en cierta medida dependería del índice antígeno anticuerpo, al haber una disminución de la fagocitosis de estos antígenos, este índice se desequilibraría y esto induciría a la formación de inmuno complejos circulantes. Por otra parte, el hígado es un depurador de grandes cantidades de inmuno complejos lo cual estaría alterado en las enfermedades crónicas del hígado y éstos podrían depositarse en otros órganos, tal se vio que ocurre en la artritis reumatoidea, en las glomérulonefritis, y en las poliarteritis nodosa, que están asociadas con antígeno australiano positivo. El otro dato llamativo es la presencia de un látex positivo en títulos altos. La prueba de látex positivo sérico se debe a la presencia de una macroglobulinemia 19 S, que actúa como anticuerpo y que es capaz de aglutinar con una gamaglobulina 7 S que se encuentra recubierta en las partículas de látex. Este es el método de Prots, el original, y según se vio después, éste no era específico para las artritis rematoideas, sino que se vio que en ciertas otras enfermedades, como fundamentalmente las sarcoidosis, la sífilis y las enfermedades crónicas del hígado, el látex se positivisaba. Estudios estadísticos montraron que de 59 pacientes con hepatitis viral la mitad tenían látex positivo y de 75 pacientes con cirrosis la positivización del látex varió entre 60 a 70 %. También lo que parece poderse correlacionar, es el nivel del título del látex con la evolución de la enfermedad; parecería que enfermos con títulos altos tienen mayor índice de mortalidad, y peor evolución de su enfermedad hepática. No está muy claro por qué estos pacientes son capaces de sintetizar una gamaglobulina 19 S anormal pero de todos

modos parecía que el aumento de esta macroglobulina anormal está directamente relacionada con la severidad del fallo hepático, medido por pruebas funcionales hepáticas y con el índices de mortalidad de la enfermedad. Bonoma demostró en 5 de 6 casos de cirrosis post-necrótica, usando gamaglobulina marcada con tiocianina que en las células linfoideas del hígado se sintetizaba esta macroglobulina que es el factor reumatoideo.

Dr. J. B. Palmitano: Con respecto a la hemorragia digestiva si bien parece clara la causa, es decir, una úlcera por decúbito de la sonda nasogástrica, yo también quería mencionar la presencia de várices, pero no en realidad en esófago, ya que en el estudio endoscópico no se vieron, y es difícil que si están no se vean, pero sí la presencia de várices en techo gástrico, las cuales generalmente no se ven, por lo menos con el fibroscopio del servicio con el cual no podemos hacer *looping*, y que esta ruptura de várices en el techo gástrico haya sido la responsable de la hemorragia severa que llevó a la muerte al paciente.

Discusión anatomopatológica

Dr. A. C. Boffi: El paciente presenta 3 puntos de interés: el cáncer, la cirrosis y la lesión esofágica. La pieza quirúrgica correspondía a una colectomía segmentaria y tenía un adenocarcinoma exofítico mucosecretante con infiltración parcial de la capa muscular, y con metástasis en un ganglio paracólico, por lo tanto es un tipo C_1 de la Clasificación de Dukes modificada por Astler y Coller. El estudio de las vísceras en la necropsia demostró que no quedaba tumor residual. La sutura colónica era continente; en esa zona había adherencias de asas de intestino delgado, vesícula biliar, y epiplón mayor. Sobre la cara anterior del páncreas se encontraron áreas de citoesteatonecrosis relacionables con la operación. El hígado pesaba 1300 g y tenía características macro y microscópicas de cirrosis multinodular; no se encontraron grandes tractos fibrosos ni otros elementos que permitieran un diagnóstico etiológico. Había áreas de transformación grasa, pero dado que el paciente era diabético es de pensar que la grasa se relacionara con su diabetes. En realidad, se trataba de una cirrosis terminal de mucho tiempo de evolución y los repetidos episodios de necrosis y regeneración muy probablemente borraron las características relacionables con factores etiológicos. Como índice de hipertensión portal, en la mucosa esofágica se encontraron venas dilatadas, y el bazo pesaba 500 g y tenía congestión crónica y fibrosis trabecular. La lesión esofágica consistió en una úlcera superficial, en la cara anterior del tercio interior de esófago, con infiltración hemorrágica del lecho; en éste había notoria fibrosis e infiltrado inflamatorio crónico, índice de una lesión antigua. En un extremo de la úlcera se observó una vena dilatada con erosión de la pared. La causa de muerte del paciente fue una hemorragia digestiva masiva ya que se encontró sangre en las luces del estómago, duodeno, intestino delgado, e intestino grueso. Otras lesiones encontradas en la necropsia fueron: ateromatosis de aorta y ramas, arteriosclerosis renal, leve arteriosclerosis pulmonar, leve hipertrofia de la pared del ventrículo izquierdo; además se encontró una gastritis crónica atrófica, e hiperplasia reaccional inespecífica en ganglios suprapancreáticos relacionable con el acto quirúrgico. Respecto a la úlcera esofágica, se ha planteado la posibilidad de que se trate de una úlcera de decúbito causada por la sonda nasogástrica. La lesión impresiona como una esofagitis erosiva relacionable con reflujo ácido desde el estómago, y por la fibrosis de su lecho parece ser más antigua que el lapso en que el paciente tuvo la sonda puesta, entre la operación y la muerte. La erosión se hizo sobre una várice, cosa que es bastante frecuente. La sonda nasogástrica puede haber actuado como factor coadyuvante al ocasionar o favorecer al reflujo ácido, y secundariamente traumatizando una zona ya erosionada.

Diagnóstico anatomopatológico

Antecedentes clínicoquirúrgicos de colectomía segmentaria por adenocarcinoma mucosecretante de ángulo hepático de colon:

1) *Ulcera péptica esofágica. Hemorragia digestiva masiva por ruptura de várice en lecho ulceroso.*
Citoesteatonecrosis peripancreática en lecho quirúrgico.
Sutura continente (anastomosis término-terminal). Adherencias de asas de intestino delgado, vesícula y epiplón.
Depleción de lípidos adrenales.
2) *Cirrosis micro y macronodular de hígado. Esplenomegalia congestiva. Várices esofágicas.*
3) *Ateromatosis de aorta y ramas. Arteriosclerosis renal.*
Arteriosclerosis pulmonar.
Hipertrofia concéntrica de pared de ventrículo izquierdo.
4) *Hiperplasia reaccional inespecífica de ganglios suprapancreáticos.*
Gastritis crónica atrófica.

Si Ud. le pregunta a un biólogo "¿Qué es lo viviente y qué es lo no viviente?", le responderá: "No se puede hablar de viviente sino respecto de un sistema que se reproduce". Para él, sólo puede hablarse de viviente a partir del día en que exista un sistema que nos provea copia de sí mismo con algunas variaciones. En una palabra, que dé motivo a la selección natural. Para el químico, por el contrario, la aparición de lo viviente sólo es pensable en un medio en donde existan ya cierto tipo de molécluas. La evolución de lo viviente no es sino la continuación de una larga evolución química.

François Jacob
Temas candentes de hoy, EMECE, 1975

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 228-232 (1981)

LA CALCIFICACION DEL ANILLO MITRAL

F. MORDEGLIA, E. T. O'FLAHERTY

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La existencia de lesiones calcificadas, de variable magnitud y extensión, localizadas en el anillo fibroso de la válvula mitral ha sido comprobada desde muchos años atrás [11, 13-15, 25, 31, 33, 33-41, 43, 44, 48]. Pero su origen, vinculación con condiciones patológicas asociadas, posibilidad diagnóstica y repercusión hemodinámica y clínica no se han establecido con demasiada claridad. Es probable que su importancia haya sido minimizada, a pesar de conocerse su peligro potencial [1-3, 6, 10, 14, 20, 28, 48]. La lesión a la que nos referimos es un trastorno degenerativo con depósito de calcio, que se pone de manifiesto en la cara ventricular de la valva posterior de la mitral, a nivel y por debajo de su anillo fibroso [13-15, 20, 24-27, 33-45]. Debe recordarse que, si bien ambas valvas tienen similar superficie, la valva posterior presenta una línea de inserción mucho más larga, mientras que la distancia de base a bordes es mayor en la valva anterior. Además, sólo la valva posterior evidencia una verdadera banda fibrosa que separa el músculo auricular del ventricular (anillo fibroso). Esta banda o anillo no sólo es punto de apoyo valvular, sino que su circunferencia se acorta en sístole de atrás hacia adelante, y contribuye, por un mecanismo de tipo "esfínter", al cierre del orificio mitral. Lógico es admitir que una grosera rigidez del anillo, debida a depósitos de calcio, dificulte esta función de cierre, permitiendo la regurgitación de sangre del ventrículo hacia la aurícula durante la sístole [14, 33, 40].

Se sostiene actualmente que la calcificación del anillo mitral (CAM) es un estadío avanzado de un proceso degenerativo inicial del colágeno del esqueleto fibroso del corazón [14, 25, 34-38, 43-45]. Tal proceso, vinculado a la repercusión de traumas mecánicos a través del tiempo, comenzaría en forma muy precoz, entre los 10 y 20 años, con cambios fibrilares del colágeno, seguido por depósitos de lípidos extra e intracelulares en las zonas afectadas; posteriormente, entre los 30 y 40 años, aparecerían pequeños focos calcificados en la región de la unión del anillo fibroso con el músculo ventricular [4]. Si la edad es muy avanzada, o si existen condiciones que magnifiquen la importancia de las fuerzas de "desgaste", las lesiones serán de mayor magnitud y, en el último caso, más tempranas. Alteraciones similares pueden aparecer en la válvula aórtica y aún en las arterias coronarias extramurales [14, 33, 40]. En la válvula aórtica, las lesiones se ubican en la cara arterial de las sigmoideas, sin fusionar las comisuras, sin dar regurgitación importante, pero pudiendo llevar a estenosis muy significativas por la inmovilidad de las valvas calcificadas [14, 33, 40, 44]. Por otra parte, el trastorno degenerativo puede extenderse, predominar o localizarse casi sólo en el esqueleto fibroso del corazón, zona vecina por donde pasa el

— — — —

Recibido: 10-XII-80. Aceptado: 4-III-81.

Dirección postal: Instituto de Investigaciones Médicas, Donato Alvarez 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina.

sistema de conducción, determinando severos trastornos en la transmisión del estímulo [14, 28, 33, 40].

El mecanismo patogénico que provoca este tipo de lesiones y lleva a la CAM se interpreta como independiente de la arterioesclerosis [14, 33, 40–45]. Pero esta última condición, que tiende a progresar con el transcurso de los años, sería capaz de agravar las lesiones de "desgaste", favoreciendo el mayor depósito de lípidos en las regiones sometidas al trauma mecánico. Se han querido relacionar las alteraciones halladas en la CAM con un mecanismo de trombosis inicial localizada [24], o bien interpretarlas como secuelas de fiebre reumática [43], pero tal forma de pensar no tendría sustento real. Si se acepta el valor patogénico de las fuerzas físicas que actúan localmente, puede explicarse con relativa facilidad la predilección de los depósitos de calcio para ubicarse en el anillo fibroso mitral y en la cara aórtica de las valvas sigmoideas [34, 33, 40, 43]. En efecto, es en tales sitios donde las presiones intraventricular izquierda y aórtica, respectivamente, actúan en forma más directa y perpendicular a la superficie del tejido subyacente. En la válvula aórtica, el máximo de presión actuando perpendicularmente al plano valvular se obtiene en diástole, cuando las sigmoideas están cerradas. En la válvula mitral esto ocurre durante la sístole, y en especial sobre la valva posterior, cuya base está rodeada por el anillo fibroso; por el contrario, el vector de presión que se dirige hacia la valva anterior lo hace casi en en forma paralela a la misma, y el flujo de sangre se desvía con facilidad hacia las sigmoideas abiertas [14, 30, 40]. Estos hechos determinan que la valva posterior y su anillo fibroso reciban la cuota más importante de la tensión generada por el ventrículo izquierdo, y que esta válvula y las cuerdas tendinosas que en ella se insertan puedan romperse con frecuencia mayor [14].

En toda circunstancia en la que se acreciente la tensión sobre la valva posterior de la mitral, dicha tensión se trasmitirá al anillo circundante, sitios donde han de ocurrir los cambios propios de la CAM. La tensión desarrollada sobre la valva posterior de la mitral aumentará en dos circunstancias. Primero, como resultado del aumento de presión intraventricular izquierda, como en la hipertensión sistémica, estenosis aórtica de distintos tipos y miocardiopatía hipertrófica [14, 24–26, 38, 40, 46]. Segundo, como resultado de una alteración o exageración del movimiento de la válvula, como ocurre en los reemplazos por prótesis metálicas y en las múltiples causas que determinan el síndrome del prolapso de la válvula mitral [2, 14, 17, 19, 27, 36]. En el prolapso valvular, al desplegarse hacia arriba la valva posterior, el ángulo que la separa del anillo fibroso se hace más abierto, la superficie valvular en contacto directo con la onda de presión es mayor y la zona de coaptación de ambas valvas es menor. Así se pierden los mecanismos que, en condiciones normales, disminuyen la trasmisión directa de las tensiones al anillo fibroso [14]. En el reemplazo mitral con prótesis metálica la resección de cuerdas y pilares, la pérdida del mencionado mecanismo de descarga que implica la coaptación de las valvas, y el aumento de masa ocasionado por la prótesis, permiten el desarrollo de mayor tensión sobre el anillo y su posible calcificación luego de cierto tiempo [2].

Por otra parte, las alteraciones degenerativas que originan la CAM podrían verse favorecidas en su aparición y progresión por otras lesiones primitivas del aparato mitral, o por alteraciones metabólicas que faciliten el depósito de lípidos y calcio, como la diabetes, hiperlipemias, hipercalcemias, etc. [10, 13–15, 34–38, 43, 44]. Pero no existen datos ciertos que permitan asegurar esta relación. Ya se mencionó que la arterioesclerosis influiría quizá de manera indirecta [14, 34–38, 43, 44]. Es llamativa la frecuencia de CAM en la mucopolisacaridosis, en especial en el síndrome de Hurler [27, 30, 42]. Y algo similar sucede con el síndrome de Marfan, aunque en esta última condición es difícil establecer si la simultánea CAM depende de una anormalidad primitiva del colágeno del anillo, el cual ha sido descripto como largo y abierto, o bien del habitual prolapso de una válvula anormalmente constituida [17, 19].

En general, tiende a admitirse que la CAM es más frecuente en mujeres, sobre todo cuando en importante o masiva, y este hecho no aceptado en forma unáni-

me no tiene una explicación satisfactoria [14, 25, 34, 37, 43, 44]. Aunque los cambios degenerativos propios de la CAM pueden desarrollarse, tanto en hombres como en mujeres, en épocas tempranas, la presencia de lesiones groseras ocurre con mucha más frecuencia en ancianos. La CAM en menores de 50 años parece poco común, excepto si existen algunas de las condiciones antes mencionadas: hipertensión sistémica, estenosis aórtica, miocardiopatía hipertrófica, prótesis mitral metálica, degeneración mixomatosa, síndrome de Marfan, síndrome de Hurler, etc.

La CAM, y probablemente las alteraciones degenerativas que la preceden, son capaces de determinar, extendiéndose a la zona vecina del esqueleto mitroaórtico, un compromiso importante del sistema de conducción A/V, tanto a nivel del nódulo como del haz de His [6, 10, 14, 28, 29, 41]. La frecuencia de distintos tipos de bloqueo A/V o intraventricular es alta en estos enfermos, muy superior a la observada al estudiar gran número de ancianos que no presentan CAM [4, 6, 10, 14, 32]. Los trastornos de conducción A/V fueron los primeros descriptos, y han sido referidos hasta en 35 % y 50 % de los casos, a veces asociados con bloqueos intraventriculares [1, 14, 37, 41, 48]. La ocurrencia de bloqueos A/V de segundo y tercer grados, considerados en conjunto, tendrían la misma frecuencia que los bloqueos de primer grado [14]. Por otra parte, se ha descripto CAM en alrededor del 10 % de los pacientes con marcapaso definitivo [14, 37, 41]. Hay también una importante incidencia de trastornos de conducción intraventricular, superior al 40 %, siendo observable el hemibloqueo anterior izquierdo en más del 20 % [14]. Y es de interés que la disfunción del nódulo sinusual puede ponerse de manifiesto en 20 % de los casos [14]. Es posible pensar, en virtud de estos hallazgos, que la CAM puede asociarse, quizá de un modo no casual, a procesos esclerodegenerativos primarios del sistema de conducción y al síndrome del nódulo sinusual enfermo [28, 29]. Además de los trastornos de conducción A/V e intraventriculares, y de la disfunción del nódulo sinusual, se describe en la CAM una alta incidencia de arritmias supraventriculares, en especial fibrilación auricular crónica [14]. Esta última ocurriría en cerca del 30 % de los casos, y podría en parte explicarse por el crecimiento auricular izquierdo que acompaña a la hipertrofia ventricular izquierda de diversas etiologías. Ya se dijo que la hipertrofia ventricular izquierda es un hallazgo habitual en la CAM, y de considerable importancia en su patogenia. En algunos pacientes, los menos, la hipertrofia auricular izquierda dependería de la existencia de una regurgitación mitral hemodinámicamente significativa, debida a la dificultad del orificio mitral para cerrarse adecuadamente [14]. Por otra parte, la cardiopatía de base puede, de por sí, como sucede en la arterioesclerosis coronaria, determinar alteraciones del miocardio auricular capaces de desencadenar arritmias.

Si bien existen publicaciones que refieren la obstrucción al flujo como complicación de la CAM masiva, y aún la posibilidad de auscultaciones más o menos parecidas a la de la estenosis mitral [20, 25, 45], parece claro que la repercusión del defecto se hace, sobre todo, gracias a un mecanismo de insuficiencia valvular [10, 13-15, 25, 33-38, 43-45]. La auscultación más frecuente sería la de la insuficiencia mitral clásica, pero no puede excluirse la percepción del soplo sistólico tardío, precedido por "click" mesosistólico, que pone en evidencia el compromiso predominante de la valva posterior [13-15, 25, 35]. Esta última auscultación, sobre todo si se propaga a base y cuello, puede hacer muy difícil su diferenciación de los soplos eyectivos aórticos, ocasionados por cambios estructurales de las sigmoideas aórticas, con o sin calcificación de las mismas. y que pueden coexistir con la CAM. La regurgitación mitral de la CAM se interpreta como debida a la rigidez del anillo, que ya no puede reducir su circunferencia moviéndose de atrás adelante durante la sístole [14, 25, 35, 37, 40]. Pero a ello podría agregarse la calcificación de la porción proximal de la valva posterior cuya arquitectura se distorsionaría, permitiendo su mayor elevación en sístole.

Uno de los potenciales peligros de la CAM es el injerto de gérmenes en el en-

dotelio que recubre al tejido alterado, y donde pueden formarse previamente trombos locales. Asimismo, existe el riesgo de que las masas calcificadas lesionen y erosionen el endotelio limitante, favoreciendo el mecanismo de trombosis o la fijación directa de gérmenes [3, 14, 47]. De esta manera la CAM se comportaría como toda valvulopatía orgánica, por lo que debe insistirse en la profilaxis de la endocarditis infecciosa en los ancianos, con o sin soplos auscultables.

La CAM es capaz de determinar complicaciones embólicas sistémicas que no son fáciles de relacionar sólo con la coexistente fibrilación auricular o el agrandamiento auricular izquierdo [14, 24, 25, 37, 39]. La mencionada posibilidad de trombosis focales en la región del endotelio que recubre a la zona calcificada, así como el desprendimiento de partículas de calcio que han erosionado los tejidos, abriéndose hacia la cavidad cardíaca, merecen ser tenidas en cuenta como causa de embolismo sistémico. Sin embargo, la complicación embólica no parece frecuente.

El estudio radioscópico, en particular la fluoroscopía con intensificación de imágenes, es el método de elección para detectar aun pequeñas cantidades de calcio depositadas en el anillo mitral, siendo su sensibilidad muy alta [22, 23]. La radioscopía convencional es útil, pero evidencia sólo calcificaciones mayores, con su forma característica en U, J o bien ovoide, en posición mitral [14]. También se considera de valor el estudio tomográfico y mucho menos sensible la radiografía simple de tórax [9, 14].

Se subraya la utilidad del ecocardiograma, si bien no parece tener la precisión de la fluoroscopía con intensificación de imágenes [5, 7, 8, 12, 14-16, 18, 21]. Se destaca la frecuente observación de bandas densas por detrás de la válvula mitral, entre ella y la pared posterior del ventrículo izquierdo. Si la calcificación es completa, de todo el anillo, la densidad cálcica se continúa con la pared posterior de la aorta, pero ello no sucede si la CAM corresponde sólo a la región posterior del anillo. Si bien por lo común las valvas mitrales se mueven bien, por delante de la sombra cálcica, es posible que ocurran anormalidades secundarias, debidas al agrandamiento y rigidez del anillo. La pendiente E-F puede ser lenta, con escasa excursión hacia adelante de la valva anterior en diástole; pero, al revés de lo que sucede en la estenosis mitral, la valva posterior se mueve normalmente, aunque a veces el calcio puede llegar a impedir la perfecta visualización de este importante detalle. También es posible que la válvula mitral sea empujada hacia adelante por el calcio rígido del anillo, disminuyendo en ocasiones el tracto de salida del ventrículo izquierdo; pero a diferencia de lo que ocurre en la estenosis subaórtica hipertrófica, no hay movimiento anormal sistólico de la valva anterior de la mitral. El ecocardiograma es útil, por lo tanto, no sólo para detectar la CAM, sino para distinguir este proceso de las calcificaciones propias de la válvula, como en las lesiones postreumáticas [5, 7, 8, 12, 14-16, 18, 21].

La CAM, como se ha visto, no debe considerarse como un dato carente de interés o como un hallazgo de autopsia. Además de que puede acompañar a cardiopatías importantes y severas, es capaz de por sí de originar manifestaciones patológicas. Su repercusión hemodinámica parece, por lo general, escasa. No serían tampoco frecuentes sus complicaciones embólicas. Pero la frecuencia de trastornos de conducción A/V e intraventiculares, las arritmias supraventriculares, sobre todo la fibrilación auricular, y la posibilidad de desarrollo de endocarditis infecciosa hacen de la CAM una entidad nosológica potencialmente peligrosa.

Bibliografía

1. Bertolatus J, Ridolfi R, Hutchins F: Complete heart block caused by calcific mitral annulus. *Johns Hopkins Med J* 135: 199, 1974.
2. Bulkley B, Morrow A, Roberts W: Calcification of the mitral annulus. A late complication of valve replacement with cage-ball prosthesis. *Am J Cardiol* 31: 123, 1973.
3. Burnside J, De Sanctis R: Bacterial endocarditis on calcification of the mitral annulus fibrosus. *Ann Intern Med* 66: 615, 1972.
4. Campbell A, Caird F, Jackson T: Prevalence of abnormalities of electrocardiograms in old people. *Br Heart J* 36: 1005, 1974.
5. Cohen H, D'Cruz I, Prabhu R: Echocardiographic abnormalities of the mitral valve in

patients with mitral annulus calcification. *Am J Cardiol* 37: 127, 1972.
6. Cohen H, D'Cruz I, Prabhu R: Abnormalities of cardiac conduction in patients with mitral annulus calcification. *Circulation* 45 y 54 (suppl II): 136, 1976.
7. Dashkoff N, Karakushensky M, Come P: Echocardiographic features of mitral annulus calcification. *Am J Cardiol* 38: 836, 1976.
8. Daskoff N, Karakushensky M, Fortuin N: Echocardiographic features of mitral annulus calcification. *Circulation* 51 y 52 (suppl II): 34, 1975.
9. Davies P, Buckey N: Tomography of the calcified aortic and mitral valves. *Br Heart J* 21: 17, 1959.
10. D'Cruz I, Cohen H, Prabhu R: Clinical manifestations of mitral annulus calcification, with emphasis on its echocardiographic features. *Am Heart J* 94: 367, 1977.
11. Epstein B: Comparative study of valvular calcifications in rheumatic and non-rheumatic heart disease. *Arch intern Med* 65: 327, 1951.
12. Ewy G, Groves B, Shy N: Echocardiographic appearance of mitral annular calcification. *Circulation* 51 y 52 (suppl II): 179, 1975.
13. Fertman M, Wolff L: Calcification of the mitral valve. *Am Heart J* 31: 580, 1946.
14. Fulkerson P, Beaver B, Auseon J, Graber H: Calcification of the mitral annulus. Etiology, clinical associations, complications and therapy. *Am J Med* 66: 967, 1979.
15. Geill T: Calcification of left annulus fibrosus (230 cases). *Acta Med Scand* 138: 153, 1950.
16. Gabor G, Mohr B, Goel P: Echocardiographic and clinical spectrum of mitral annulus calcification. *An J Cardiol* 38: 836, 1976.
17. Goodman H, Dorney E: Marfan's syndrome with massive calcification of the mitral annulus at age of twenty-six. *Am J Cardiol* 24: 426, 1969.
18. Graber H, Fulkerson P, Auseon J: Echocardiographic demonstration of mitral annular calcification. *Circulation* 51 y 52 (suppl II): 34, 1975.
19. Grossman M, Knott A, Jacoby W: Calcified annulus fibrosus with mitral insufficiency in the Marfan's syndrome. *Arch Intern Med* 121: 561, 1968.
20. Hammer W, Roberts W, de León A: "Mitral stenosis" secondary to combined "massive" mitral annular calcific deposits and small hypertrophic left ventricles. *Am J Med* 64: 371, 1978.
21. Hirschfield D, Emilson B: Echocardiogram in calcified mitral annulus. *Am J Cardiol* 38: 836, 1976.
22. Jorgens J, Blank N, Wilcox W: The cinefluorographic detection and recording of calcifications within the heart; results of 803 examinations. *Radiology* 74: 550, 1960.
23. Jorgens J, Lieber A: The use of cinefluorography in acquired heart disease. *Circulation* 24: 831, 1961.
24. Kirk R, Russel J: Subvalvular calcification of mitral valve. *Br Heart J* 31: 580, 1946.
25. Korn D, De Sanctis R, Sell S: Massive calcification of the mitral annulus. *N Engl J Med* 267: 900, 1962.
26. Krauss K, Weisinger B, Glassman E: Mitral annular calcification and subaortic stenosis. *Circulation* 45 y 46 (suppl II): 178, 1972.
27. Krovetz J, Mc Laughlin T, Silverber G: Cardiovascular manifestations of the Hurler's syndrome. *Circulation* 31: 132, 1965.
28. Lenègre J: Etiology and pathology of bilateral bundle branch block in relation to complete heart block. *Prog Cardiovasc Dis* 6: 409, 1964.
29. Lev M: Anatomic basis for atrioventricular block. *Am J Med* 37: 742, 1974.
30. Lindsay S: The cardiovascular system in gargolism. *Br Heart J* 12: 17, 1950.
31. Marks J: Calcification of the annulus of the mitral valve. *N Engl J Med* 214: 441, 1936.
32. Ostrander L, Brandt R, Kjelberg M: Electrocardiographic findings among the adult population of a total natural community. *Circulation* 31: 888, 1965.
33. Perloff J, Roberts W: The mitral apparatus. Functional anatomy of mitral regurgitation. *Circulation* 46: 227, 1972.
34. Pomerance A: Aging changes in human heart valves. *Br Heart J* 29: 222, 1967.
35. Pomerance A: Cardiac pathology and systolic murmurs in the elderly. *Br Heart J* 30: 687, 1968.
36. Pomerance A: Ballooning deformity (mucoid degeneration) of the mitral valve. *Br Heart J* 31: 343, 1969.
37. Pomerance A: Pathological and clinical study of calcification of mitral valve ring. *J Clin Pathol* 23: 354, 1970.
38. Pomerance A, Davies M: Pathologic features of hypertrophic obstructive cardiomyopathy in the elderly. *Br Heart J* 37: 305, 1975.
39. Ridolfi R, Hutchins G: Spontaneous calcific emboli from calcifie annulus fibrosus. *Arch Path Lab Med* 100: 117, 1976.
40. Roberts W. Perloff J: Mitral valvular disease. *Ann Intern Med* 77: 939, 1972.
41. Rytand D, Lipsitch L: Clinical aspects of calcification of the mitral annulus fibrosus. *Arch Intern Med* 78: 554, 1946.
42. Schieken G, Kerber R, Ionasescu V: Cardiac manifestations of the mucopolysacchardiosis. *Circulation* 52: 700, 1975.
43. Schott G, Kotler M, Parry W: Mitral annular calcification. *Arch Intern Med* 137: 1143, 1977.
44. Sell S, Scully R: Aging changes in the aortic and mitral valves. *Am J Pathol* 46: 345, 1965.
45. Simón M, Liu S: Calcification of the mitral valve annulus ands its relation with the functional valvular disturbance. *Am Heart J* 48: 497, 1954.
46. Tajik A, Giuliani E, Frye R: Mitral valve and/or annular calcification associated with idiopathic hypertrophic subaortic stenosis. *Circulation* 45 y 46 (suppl II): 228, 1972.
47. Watanaknakorn C: *Staphylococcus aureus* endocarditis on the calcified mitral annulus fibrosus. *An J Med Sci* 266: 219, 1973.
48. Yater W, Cornell V: Heart block due to calcareous lesions of the bundle of His. *Ann Intern Med* 8: 777, 1935.

 ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 233-243 (1981)

TRANSPLANTE DE MEDULA OSEA Y RECONSTITUCION INMUNOLOGICA

ISABEL PIAZZON *, **CHRISTIANE DOSNE PASQUALINI** **

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

El transplante de médula ósea se ha constituido en el tratamiento de elección en las inmunodeficiencias combinadas graves del niño, en las anemias aplásticas y en la leucemia mieloide aguda; se trata de reemplazar las células progenitoras (*stem cells*) en casos donde faltan por defectos genéticos, por causas idiopáticas o por destrucción después de irradiación y/o de quimioterapia intensiva. Es un procedimiento en sí relativamente sencillo pero que se debe considerar todavía en etapa experimental por las siguientes razones: 1) se desconoce hasta ahora la etiología de estas enfermedades; 2) la elección del dador no es sencilla puesto que aun en casos de gemelos pueden observarse reacciones adversas; 3) las infecciones post-transplante, especialmente las neumonitis intersticiales, son difíciles de evitar o controlar; 4) las reacciones de injerto contra huésped agudas y crónicas crean problemas difíciles de resolver; 5) la reconstitución inmunológica implica el establecimiento de una quimera y la normalización del desequilibrio inmunológico que acompaña forzosamente al injerto. Este número grande de incógnitas podrá ser resuelto solamente con una estrecha colaboración entre las cuidadosas observaciones de los enfermos trasplantados y los experimentos llevados a cabo en animales de laboratorio. El objeto de este trabajo es hacer una reseña de lo que se ha logrado en la clínica y una discusión de los posibles mecanismos en juego en base a los experimentos pertinentes en animales de laboratorio.

Reseña histórica

El transplante de médula ósea tuvo su origen en 1948 con los experimentos de Jacobson y de Lorenz y sus colaboradores, quienes demostraron que ratones irradiados con dosis letales podían sobrevivir si el bazo era protegido de los rayos [43] o si se los sometía a un transplante de médula ósea [52]. Al principio se atribuyó ese efecto protector a un factor humoral [44] hasta que, en 1956, tres grupos de investigadores demostraron independientemente que las células de la médula del dador colonizaban en el huésped llevando a una reconstitución hematopoiética permanente [26, 57, 86]. Al año siguiente, Thomas y col. [83] hacían un trasplante en el hombre, demostrando que era factible transfundir un gran número de células de médula ósea. En 1958, Mathé y col. [55] trataron 6 víctimas de un accidente de irradiación con un injerto de médula, con recuperación de algunos de ellos en

---

Recibido: 4-III-1981. Aceptado: 11-III-1981.

* Becaria del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET.

Dirección postal: Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Las Heras 3092, 1425 Buenos Aires, Argentina.

base a sus propias células medulares. En 1968, Bach y col.[7] hicieron con éxito el primer trasplante en un niño con un síndrome de Wiscott-Aldrich mientras que Gatti y col.[30] también conseguían por ese medio la sobrevida de otro caso de inmunodeficiencia combinada grave. A pesar del entusiasmo que acompañó a estos primeros ensayos clínicos, una valoración de los resultados globales publicada en 1970[13] era poco alentadora: la mayoría de los transplantes se habían llevado a cabo en enfermos graves, en las últimas etapas de leucemias agudas o de anemia aplástica, de tal modo que los enfermos morían antes de poder apreciar los beneficios del transplante. En esta última década, sin embargo, los avances en el manejo de los enfermos antes y después del transplante fueron tan importantes que en la actualidad se puede lograr con esta terapia una larga sobrevida, y hasta se habla de curación, en enfermedades como la anemia aplástica, la leucemia mieloide aguda y las inmunodeficiencias combinadas en las cuales los demás tratamientos han fracasado.

Resultados clínicos

A pesar de que no se conoce la etiología de la leucemia ni, en muchos casos, de la anemia aplástica, en la actualidad, en ambas enfermedades, el tratamiento con un transplante de médula ósea ha significado un cambio radical en el pronóstico de los pacientes. En el *Fred Hutchinson Cancer Center* de Seattle, en el Servicio que dirige E. D. Thomas, en más de 100 casos, se registró un 75 % de sobrevida, de más de 2 años, en pacientes con anemia aplástica que no habían recibido transfusiones anteriormente, un 65 % en leucemias agudas no-linfoblásticas en primera remisión y un 50 % en leucemias agudas linfoblásticas en segunda o subsiguientes remisiones[80-85]. En Inglaterra, Powles y col.[65] confirmaron estos resultados en leucemia mieloide aguda, con 64 % de sobrevida en 22 pacientes, mientras otros centros están repitiendo el mismo tratamiento[11, 36, 73]. Recientemente, en México, se realizó con éxito el primer transplante en un caso de anemia aplástica[72]. En cuanto a las inmunodeficiencias combinadas graves, una evaluación de los resultados publicada en 1977[14] registró un 29 % de sobrevida en 69 casos, con mejor pronóstico con transplante de médula ósea que con hígado y/o timo fetales, y en menores de 6 meses.

Uno de los más importantes factores de éxito es indudablemente la selección del dador. Un mellizo uniovular es lo ideal, a pesar de que aun en algunos de ellos se observaron ciertas reacciones de injerto contra huésped, especialmente en casos de anemia aplástica[3, 33, 67]. Que el enfermo tenga un hermano gemelo es excepcional, por lo cual se busca entre los hermanos o los padres un dador compatible a nivel del complejo mayor de histocompatibilidad (Fig. 1),[59] que tenga por lo menos un haplotipo HLA-A y B, serológicamente idéntico, y negatividad en reacciones mixtas de linfocitos, por identidad a nivel de HLA-D. Esta combinación se encuentra en menos de la mitad de los casos, por lo cual a menudo se llega a buscar un dador compatible entre los familiares más lejanos[18], con miras a obtenerlos también entre el resto de la población por medio de registros de computación. Por otra parte, lo mismo que en transplantes de riñón[54], se han realizado algunos transplantes de médula empleando dadores no-histocompatibles con cierto éxito[38]. En todo caso, la compatibilidad a nivel del HLA-D parece ser la más importante, es decir, la confirmación in vitro de una reacción mixta de linfocitos negativa[45].

Puede resultar de interés dar algunos detalles del procedimiento a seguir para

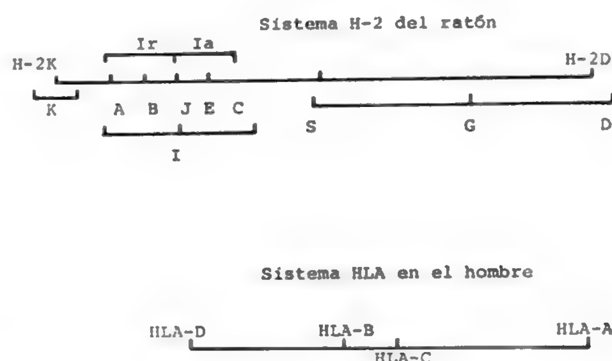


Fig. 1. — Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). **En el ratón:** Sistema H-2, localizado en el cromosoma 17 contiene 5 regiones alélicas, K, I, S, G, D de las cuales la región I se subdivide en 5 subregiones. **En el hombre:** Sistema HLA localizado en el cromosoma 6, contiene 4 loci HLA-A, B, C, D de los cuales A, B, C corresponden a las regiones K y D del sistema H-2, y HLA-D a la región I.

efectuar un transplante de médula ósea según los criterios aplicados por Thomas y col. [80-82, 84, 85]. En cuanto a la técnica en sí, mediante diversas aspiraciones en cresta ilíaca anterior y posterior, se extrae del dador, bajo anestesia general, 500 a 750 ml de médula ósea (mezclada con sangre), la que se transfunde al huésped lo más pronto posible; se calcula que se llegan a administrar así 10^8-10^9 células/kg. Como pretratamiento, el paciente leucémico recibe 60 mg/kg/día de ciclofosfamida durante 2 días, seguido 3-4 días después, de una irradiación corporal total de 1000 rad inmediatamente antes de la transfusión de médula. En la anemia aplástica, se administra 50 mg/kg/día de ciclofosfamida durante 4 días, seguidos 36 h más tarde por la transfusión de médula. En ambos casos, después del transplante, se administra metotrexate en forma intermitente durante los primeros 100 días. Es durante estos primeros 4 meses que se pierden muchos enfermos, siendo la primera causa de muerte las infecciones como consecuencia de la insuficiencia inmunológica. Las infecciones micóticas son las más frecuentes, seguidas de las virales, como por herpes simplex y varicella-zoster, pero las más graves son las neumonías intersticiales por citomegalovirus u otros gérmenes [80]. Los mayores avances se han logrado principalmente en base a los medios utilizados para combatir estas infecciones. Estos consisten en el aislamiento del enfermo en un ambiente estéril, con flujo laminar, con alimentación totalmente esterilizada, con administración profiláctica de antibióticos y transfusiones de granulocitos. Se ha visto, además, que es importante asegurar una hiperalimentación, aun por cateterismo grueso si fuera necesario. Estos cuidados configuran una terapia de un costo tan elevado que se ha planteado la pregunta de si se halla justificada [28, 48].

Con todas estas precauciones, el rechazo del injerto es hoy poco frecuente y la muerte temprana por infecciones suele evitarse. La reconstitución inmunológica se consigue dentro del primer año en los enfermos que no desarrollan una reacción de injerto contra huésped, mientras que los que la padecen se mantienen durante mucho más tiempo con anomalías inmunológicas; éstas se traducen en infecciones recurrentes las cuales ponen repetidamente en peligro la vida del enfermo. A pesar de la histocompatibilidad entre el dador y el huésped, y de la profilaxis con metotrexate, alrededor de la mitad de los transplantados desarrollan reacciones de injerto contra huésped. La reacción aguda se manifiesta con erupciones cutáneas, alteraciones hepáticas, diarrea, infecciones y alteraciones de las funciones inmunológicas. En cuanto a la reacción tardía, se trataría de un síndrome pleiotrópico que recuerda las enfermedades autoinmunes del tipo de la escleroderma y del lupus eritematoso diseminado; aparece de 100 a 300 días post-transplante y afecta órganos no generalmente involucrados en la reacción aguda, como ser la mucosa oral, las glándulas lagrimales, el esófago, las serosas y los músculos; su frecuencia aumenta con la edad del enfermo y proporcionalmente a la severidad de los síntomas de la reacción aguda que la precedió. El tratamiento indicado consiste en prednisona y azatioprine aunque suele ser poco efectivo.

Al combatir más eficientemente las infecciones, queda como problema primordial la alta incidencia de reacción de injerto contra huésped en los transplantados. Recientemente, se ha propuesto el uso de la ciclosporina A, un metabolito fungoide con efecto inmunosupresor, el cual se administra diariamente desde el día anterior al trasplante, con lo cual se prevendría en cierta medida su desarrollo [35, 64]. Como las reacciones de injerto contra huésped son desencadenadas por los linfocitos T del dador, como veremos más adelante, se ha propuesto tratar la médula antes de transfundirla, con el fin de eliminar estos linfocitos, empleando diversos procedimientos [9, 70]. Otros proponen la irradiación linfoide total del huésped en casos de aplasia medular [77] con miras a destruir los linfocitos T del huésped que podrían servir de blanco para la reacción de injerto contra huésped [74]. Por otro lado, hay evidencia de que esta reacción de injerto contra huésped puede llegar a ser beneficiosa en casos de leucemia, puesto que eliminaría las células leucémicas evitando una posible recaída, por un fenómeno de-

nominado de injerto contra leucemia [47, 58, 71].

En las formas graves de inmunodeficiencia combinada en niños de pocos meses, el tratamiento de elección es el transplante de médula ósea siempre que se encuentre un dador histocompatible. Al no encontrarlo —y eso se da en más de la mitad de los casos— se intentaron transplantes de timo y/o hígado fetales, de menos de 12 semanas de gestación. El primer transplante de timo en un síndrome de DiGeorge o agenesia tímica, produjo una reconstitución inmunológica permanente, sin signos de injerto contra huésped [17]; en dos casos de inmunodeficiencia combinada se consiguió la normalización del sector T [2, 66], mientras que en un tercero se logró la reconstitución de ambos sectores, T y B [16]. Se consiguieron también resultados alentadores al transplantar timo fetal previamente cultivado in vitro [15, 41, 42]; de esta manera se eliminarían todos los linfocitos preservando solamente el epitelio tímico de tal modo que la reconstitución inmunológica se haría en base a las células del huésped, con todas las complicaciones que se verán más adelante. Con trasplantes de hígado fetal, sólo se consiguieron resultados positivos en contados casos [1, 49], por lo cual se suele concluir que los tejidos fetales no han tenido el éxito que era dable esperar en base a lo observado en ratones irradiados [14, 31, 32], mientras que el transplante de médula suele llevar a una reconstitución inmunológica con desarrollo de la función normal del timo [21, 37, 65].

Reconstitución inmunológica

Cómo explicar la reacción de injerto contra huésped

Si bien la aceptación del injerto se logra hoy en la generalidad de los casos, el mayor obstáculo para el éxito permanente y la sobrevida del paciente lo constituye la aparición *a posteriori* de una reacción de injerto contra huésped. Su incidencia es del 40 al 70 % en casos donde el dador y el huésped son totalmente histocompatibles para los loci HLA-A y B y con reacción negativa en el cultivo mixto de linfocitos (HLA-D) [80] (Fig. 1). Se la ha atribuido, por ende, a diferencias en antígenos menores de histocompatibilidad, lo que también se ha visto cuestionado al encontrarla aún en casos donde el dador era un gemelo [3, 33, 67]. La reacción de injerto contra huésped representaría la respuesta inmune de los linfocitos T del dador después de su colonización en el huésped al encontrarse con antígenos de histocompatibilidad diferentes de los suyos. Estos linfocitos T estimulados de esta manera serían los responsables, a su vez, del daño tisular ocasionado, llevando primero a la reacción aguda, y a veces a la muerte, seguida en ciertos enfermos de la reacción crónica, la cual en casos extremos conduciría a fenómenos de autoinmunidad, infecciones repetidas y en consecuencia alto riesgo de muerte.

Los linfocitos T que reaccionan contra los antígenos mayores de histocompatibilidad no-propios, denominados linfocitos T alorreactivos, se encuentran en individuos normales con una frecuencia muy superior a la de las células T que reaccionan contra antígenos convencionales (cualquier otro antígeno); se calcula que de 3 a 6 % de los linfocitos T de todo individuo —no inmunizado— son capaces de reaccionar contra cualquier antígeno HLA o H-2 no-propio [5, 27]. Sin embargo, existe la posibilidad de que la reacción de los linfocitos T a antígenos convencionales pudiera estar muy ligada a la alorreactividad, y se discute si el mismo linfocito T podría tener receptores para ambas reacciones [89]. Esto explicaría por qué las infecciones aumentan la incidencia de reacciones de injerto contra huésped. En apoyo de este concepto está el hecho de que el adelanto más grande en la prevención de la reacción de injerto contra huésped y/o su atenuación lo ha constituido la profilaxis contra las infecciones intercurrentes, con desinfección a veces del dador pero especialmente del huésped con todas las medidas mencionadas anteriormente, involucrando un régimen de hiperalimentación para mantener en lo posible el buen estado general del paciente [81, 82].

Siendo los linfocitos T del dador los responsables de la iniciación de la reacción de injerto contra huésped se comprende fácilmente que se hayan hecho muchos intentos para eliminar estas células de la médula a transplantar. Se emplearon diversos métodos tanto en sistemas animales

como en la clínica. Estos incluyen el uso de suero antilinfocito, antitimocito, antitheta [9, 22, 37, 86], el fraccionamiento celular, eliminando las células que rosetean con glóbulos rojos de carnero y las que se estimulan frente a la fitohemaglutinina [70] y numerosos otros procedimientos [20]. Teóricamente, el beneficio obtenido no sería más que temporario ya que la médula transplantada sería capaz de originar la serie linfocitaria.

El estímulo de los linfocitos T del dador que lleva a la reacción de injerto contra huésped implica también la reacción de los linfocitos del huésped, en una compleja interrelación que ha sido muy estudiada en ratones [19, 23, 76] sin haberse llegado aún a una explicación muy clara del mecanismo puesto en juego. Es para evitar la reacción del huésped que se lo trata con inmunosupresores, habiéndose descartado los sueros antilinfocitarios y los corticoides para reemplazarlos en la actualidad con metotrexate o ciclosporina A [64, 84, 95]; éstos actuarían facilitando en primer término la aceptación del injerto y previniendo luego la reacción del injerto contra huésped. De todas maneras, el hecho de que se hayan observado supuestamente signos de injerto contra huésped entre gemelos, pone en tela de juicio la necesidad de histoincompatibilidad para su desencadenamiento, y apoyaría la teoría de desequilibrio inmunológico propuesta por Reinherz y col. [68, 69]: estos autores postulan que la relativa falta de linfocitos T supresores en el huésped (células más sensibles a la irradiación que los demás linfocitos) permitiría la exagerada proliferación de linfocitos T efectores, "autoreactivos". De todos modos, se puede postular que la reacción de injerto contra huésped constituye una lucha entre el sistema linfoide del dador y el del huésped, la cual precede a la aceptación completa del injerto con establecimiento de una quimera, a menos que llegue a vencer el ataque "citotóxico" del dador produciendo la muerte del huésped.

Los beneficios de la reacción de injerto contra leucemia

Al determinar que las reacciones de injerto contra huésped se debían primordialmente al "ataque" de los linfocitos T del dador, era lógico pensar que no sólo las células normales del huésped sino también las células leucémicas se verían atacadas. Este efecto denominado injerto contra leucemia se confirmó en distintos modelos animales [24, 71]. En el hombre, la principal evidencia a favor de tal inmunoterapia pasiva, como la denominaron Mathé y col. [56], reside en el hecho de que las recaídas leucémicas en pacientes sometidos a trasplantes de médula ósea son más frecuentes con dadores gemelos que cuando se utilizan dadores alogeneicos y entre estos últimos, algo más frecuentes en los que no desarrollaron reacciones clínicas de injerto contra huésped [87]. Otros autores [55] describen recaídas leucémicas seguidas de remisiones atribuibles a reacciones de injerto contra huésped.

Restricción de las funciones T por el complejo mayor de histocompatibilidad

La observación del fenómeno de injerto contra leucemia y el manejo más adecuado de esquemas tendientes a prevenir o mitigar los efectos nocivos de las reacciones de injerto contra huésped, han llevado a la utilización de combinaciones dador-huésped cuya compatibilidad no sólo no es completa sino que en algunos casos dista bastante de serlo. Pacientes con deficiencias tímicas son usualmente transplantados con tejido tímico fetal. Es frecuente también el trasplante de células de hígado fetal como tratamiento de deficiencias a nivel de células progenitoras de la serie linfoide. Puesto que el trasplante de estos tejidos fetales no produce reacciones de injerto contra huésped, en este tipo de injertos usualmente no se busca compatibilidad a nivel del HLA. Resulta entonces importante conocer los riesgos que implican el trasplante de tejidos fetales tímicos y de hígado, y el de médula ósea no compatibles a nivel del complejo mayor de histocompatibilidad.

Para combatir una infección —por ejemplo una infección viral—, el sistema inmune cuenta normalmente con una serie de poblaciones celulares que interactúan entre sí y que se encuentran reguladas de modo de lograr respuestas satisfactorias que, en la mayoría de los casos, permiten la eliminación del germen patógeno. Así,

a grandes rasgos, los linfocitos B son los responsables de la síntesis de anticuerpos, y los linfocitos T citotóxicos se encargan de destruir las células infectadas por el virus. Existen, además, otras poblaciones que intervienen en la respuesta inmune. Para la gran mayoría de los antígenos es necesario que células denominadas linfocitos T colaboradores *(helper)* interactúen con los linfocitos B de manera que éstos puedan cumplir adecuadamente sus funciones. Del mismo modo, también resulta necesario que linfocitos T colaboradores interactúen con los T citotóxicos de modo que se pueda generar una respuesta citotóxica adecuada. En la mayoría de los casos, inicialmente, los macrófagos procesan al antígeno y es necesario que el linfocito T colaborador "vea" al antígeno presentado por los macrófagos para poder "enterarse" de su presencia en el organismo y poder montar una respuesta efectiva contra él. Existen también linfocitos T supresores que regulan el nivel de la respuesta inmune actuando a través de los linfocitos T colaboradores. Para que todas estas interacciones celulares se cumplan normalmente es necesario que las células en juego compartan los mismos antígenos mayores de histocompatibilidad [50-90].

Así, el linfocito T colaborador que interactúa con el macrófago posee una doble especificidad: el primer nivel de especificidad está dado a través del receptor específico para el antígeno y el segundo por los antígenos codificados por la región I (HLA-D) del complejo mayor de histocompatibilidad. Esto significa que una determinada célula T podrá "enterarse" de la presencia del antígeno –en este caso el virus– sólo si éste le es presentado por un macrófago que exprese en su superficie, además del antígeno viral, el mismo antígeno Ia que dicho linfocito T. Este doble nivel de especificidad existe también en la interacción linfocito T colaborador-linfocito B. El linfocito T colaborador específico para el *carrier* del antígeno, solamente va a poder colaborar con linfocitos B que expresen su mismo antígeno Ia. La interacción T citotóxico-T colaborador se encuentra también restringida por antígenos de la región I mientras que la de los T supresores lo está por la subregión I-J del H-2 (Fig. 1). En cuanto a la interacción de las células T citotóxicas con la célula blanco infectada, la restricción está dada por moléculas de las regiones K o D del H-2 (HLA-A y B). Es decir, cuando se inmuniza con un virus determinado, el individuo generará células T citotóxicas específicas para ese virus y además específicas para células que expresen el mismo antígeno de histocompatibilidad K o D en su superficie. Dichos linfocitos T no serán citotóxicos ni para sus mismas células infectadas con otro virus, ni lo serán para células infectadas con el virus en cuestión pero que expresen moléculas K y D de otra especificidad (Fig. 2). De esta manera se ha observado que las interacciones celulares en las que participan linfocitos T sólo se realizan si media el reconocimiento de los antígenos mayores de histocompatibilidad propios. Esta capacidad de las células T para reconocer los antígenos de histocompatibilidad propios se adquiere durante el pasaje de las células T por el timo [60, 89]. Las células T saldrían del timo con estructuras de reconocimiento (receptores) adecuadas para interactuar con los antígenos mayores de histocompatibilidad expresados por el epitelio tímico.

Las implicaciones prácticas que tienen estos hechos para la reconstitución inmunológica del huésped transplantado cobran fundamental importancia cuando se utilizan dadores alogeneicos cuyo grado de histoincompatibilidad con el huésped es grande. Muchos de estos intentos de reconstitución fracasan [53] y en algunos casos

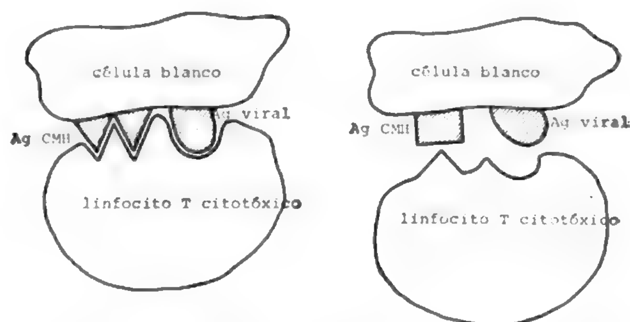


Fig. 2. — Restricción de la función T por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), conocido como fenómeno de Zinkernagel y Doherty. Sólo puede haber lisis celular si el linfocito T citotóxico posee además del receptor para el antígeno viral, el receptor para el H-2 o HLA expresado en la superficie de la célula blanco. Todavía no se sabe si se trata de dos receptores diferentes o de un solo receptor que reconozca la asociación de los dos antígenos

se registran desórdenes de inmunorregulación graves. En gran parte estos fracasos podrían explicarse por lo anteriormente expuesto. Si un paciente con defectos en su epitelio tímico, es transplantado con un timo fetal incompatible HLA-A^b-B^b-D^b, las células que se diferenciarán en ese timo aprenderán a reconocer estos marcadores del timo dador como propios (pero no los suyos HLA-A^α-B^α-D^α). Estas células T serán entonces incapaces de interactuar eficientemente con sus propias estructuras celulares de tipo *a*. De modo que el paciente poseerá células T que no serán capaces de funcionar adecuadamente, ya que no podrán interactuar ni entre sí ni con el resto de las células del organismo. Una paradoja similar surge cuando un paciente con timo funcional pero con defectos a nivel de células progenitoras es transplantado con células de hígado fetal, incompatibles con los antígenos HLA expresados por el epitelio tímico del huésped. Obviamente, estos ejemplos resultan extremos y presuponen que el epitelio tímico del primer huésped o las células progenitoras del segundo, no funcionan en absoluto. Sin embargo, es necesario recalcar que ya sea en estos casos como en los transplantes de médula ósea, las condiciones mínimas que se requerirían para restaurar realmente la inmunocompetencia del huésped serían: *a*) el epitelio tímico y las células progenitoras linforreticulares deben compartir al menos un haplotipo HLA-D; *b*) el epitelio tímico, las células progenitoras linforreticulares y el resto de las células somáticas deben compartir al menos uno de los posibles antígenos HLA-A o HLA-B. Esto dejaría al paciente con deficiencias en su sistema inmune. Por debajo de estos requisitos posiblemente resulten inútiles los esfuerzos por mejorar las condiciones del transplante. Por último, es necesario comprender que para determinar el real estado de inmunocompetencia de los pacientes transplantados, el monitoreo inmunológico debe incluir fundamentalmente respuestas T restringidas. Es así que un paciente puede poseer un número normal de linfocitos, un porcentaje normal de rosetas E, buenas respuestas a ciertos mitógenos y en el cultivo mixto de linfocitos, sus células pueden responder y estimular en forma normal, y sin embargo su sistema inmune puede estar casi totalmente incapacitado para llevar a cabo las funciones necesarias para combatir una infección (Fig. 2).

Aceptación del injerto con normalización de la función inmunológica

Histocompatibilidad entre dador y huésped constituye hasta ahora el factor determinante de la aceptación, o no-rechazo, de la médula trasplantada; esto se consigue en la gran mayoría de los casos, sin condicionamiento inmunosupresor en gemelos, en las inmunodeficiencias combinadas y, por supuesto, en los accidentes de irradiación, pero en cambio, con la ayuda de irradiación y/o inmunosupresores en casos de leucemia y aún de anemia aplástica. El problema surge cuando no existe un familiar histocompatible con el enfermo. Comparativamente, se han realizado muchos más trasplantes de riñón en los cuales se ha logrado la aceptación del órgano en presencia de histoincompatibilidad relativa y hasta con un efecto beneficioso de transfusiones de sangre previas al injerto [54]; esto último no está confirmado en transplantes de médula y hasta estaría contraindicada la transfusión en casos de anemia aplástica [75], tal vez por la naturaleza misma de la enfermedad [4], ya que en casos de leucemia no se han visto efectos nocivos atribuibles a la transfusión. El hecho es que, una vez superadas la reacción de injerto contra huésped y las infecciones, llega un momento en que la aceptación del injerto, sea de riñón o de médula, se hace permanente y total, de tal manera que no se consigue más respuesta inmune a la administración de células provenientes del dador, ni in vitro ni in vivo, posibilitando una sobrevida larga y hasta la curación del enfermo. El mecanismo por el cual el desequilibrio inmunológico provocado por el injerto alogeneico se convierte en la aceptación indefinida con normalización de la función inmunológica sigue siendo un enigma, de la misma manera que lo es la relación materno-fetal, o la relación tumor-huésped, o las quimeras creadas en los ratones tetraparentales [12, 40]. Como se ha discutido en revisiones anteriores [54, 61, 62] se puede

postular la existencia de: 1) factores bloqueantes o exacerbantes presentes en el suero y capaces de impedir el efecto citotóxico de los linfocitos T, compuestos por complejos antígeno-anticuerpo y/o antígeno libre [39, 40]; 2) un antígeno con su correspondiente anticuerpo directamente vinculados a la exacerbación y diferentes de los relacionados con el rechazo, lo que significaría una aceptación activa del injerto y no una falta de rechazo [51]; 3) un aumento relativo de células supresoras que impediría el efecto citotóxico de los linfocitos T efectores [68, 69]; 4) anticuerpos antiidiotipos (anti-anticuerpos) y formación de una red de estímulo-supresión, tal como fue propuesta por Jerne y otros [10, 12, 46]. Queda por determinar, además, si en todos los casos se establece una quimera con co-existencia de células del dador y del huésped o si se consigue una regulación normal solamente de las células del huésped que eventualmente puedan resurgir.

Neoplasias linforreticulares a consecuencia de un desequilibrio inmunológico

Los enfermos portadores de un injerto de riñón funcionante tienen una incidencia muy aumentada de cánceres, con prevalencia de tumores linforreticulares; la latencia promedio es de 34 meses post-transplante, a pesar de que el 8 % de los linfomas se manifiestan en los primeros 4 meses. El mecanismo responsable de este riesgo aumentado hasta 350 veces en los transplantados renales sigue siendo una incógnita; entre todas las postulaciones discutidas en un trabajo anterior [54] la más probable en este momento parecería ser el desequilibrio inmunológico que acompaña la aceptación de un órgano alogeneico bajo un régimen inmunosupresor sostenido durante largo tiempo. En los transplantes de médula ósea la situación parece ser muy distinta, tal vez porque son mucho menos numerosos que los injertos renales o porque el tratamiento inmunosupresor es más selectivo y menos prolongado; ésta última parecería ser la razón. Lo que se ha observado muy ocasionalmente es la transformación maligna de las células del dador en pacientes con leucemia: Thomas y col. [25, 73, 79, 85] describen dos casos de niñas con leucemia linfoblástica aguda que habían recibido sólo irradiación antes del transplante de médula proveniente de un hermano histocompatible. Después de la aceptación del injerto, sin síntomas de reacción de injerto contra huésped ni de infecciones, a los 69 y 135 días, respectivamente, presentaron una recaída leucémica. Estudios citogenéticos permitieron determinar que las células leucémicas contenían un cromosoma Y y que, por ende, provenían del dador. A estos 2 casos se puede añadir el descripto por Gossett y col. [34] con la aparición de un sarcoma inmunoblástico en las células del dador, 3 meses post-transplante en un paciente con una leucemia mieloide aguda. Finalmente, de 30 casos de inmunodeficiencia combinada que recibieron un injerto de timo fetal, cultivado in vitro, 3 desarrollaron un linfoma linfoblástico B que los llevó rápidamente a la muerte [15]. Estos casos son de difícil explicación. De nuevo un desequilibrio inmunológico parecería estar en la base del proceso, tal vez con la participación de virus oncogénicos tipo C o tipo Herpes [60]. Estos virus, que tienen un tropismo especial para los linfocitos, serían activados por los rayos X y eventualmente provocarían una estimulación crónica del sistema linfoide, la cual, según datos experimentales recientes de nuestro laboratorio, podrían desencadenar procesos linforreticulares y/o leucemias [63]. Por otra parte, se han descripto estos procesos en ratones híbridos que sobreviven a la reacción de injerto contra huésped provocada por la inoculación de linfocitos de las cepas paternales [19].

En *conclusión*, se puede decir que el transplante de médula ósea promete convertirse en un tratamiento cada vez más efectivo para ciertos casos de leucemia, especialmente las agudas no linfoides, en la anemia aplástica y en las inmunodeficiencias combinadas severas. La aceptación del injerto se obtiene en la mayoría de los casos bien seleccionados, a pesar de lo cual, la reacción de injerto contra huésped con la consecuente alta incidencia de infecciones, constituye el problema clínico de más difícil resolución. Sin embargo, en ciertos casos de leucemia, hay evidencia

de que puede convertirse en factor beneficioso en forma de injerto contra leucemia. El desequilibrio inmunológico provocado por el injerto de médula se debería en gran parte al fenómeno de Zinkernagel y Doherty, o restricción de la función T por los antígenos mayores de histocompatibilidad, según la cual los linfocitos T del dador no podrían combatir efectivamente las infecciones que abarquen las células del huésped, cuando la histocompatibilidad no es completa. De todos modos, la aceptación indefinida del injerto, necesaria para la sobrevida larga y/o curación del enfermo, significa la normalización de la función inmunológica, estableciéndose una quimera, con tolerancia de las células no-propias, provenientes del dador. No se conoce el mecanismo por el cual se consigue dicha tolerancia ni su relación con la reacción de injerto contra huésped. Es de esperar que los esfuerzos de los próximos años, tanto clínicos como experimentales, lleguen a aclarar las incógnitas involucradas, que van desde la etiología de las enfermedades en cuestión hasta la ontogenia y regulación del sistema inmune.

Bibliografía

1. Ackerat C, Plüs HJ, Hitzig WH: Hereditary severe combined immunodeficiency and adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Res* 10: 67, 1976.
2. Ammann AJ, Wara DW, Salmon S et al: Thymus transplantation: permanent reconstitution of cellular immunity in a patient with sex-linked combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 289: 5, 1973.
3. Appelbaum FR, Fefer A, Cheever MA et al: Treatment of aplastic anemia by bone marrow transplantation in identical twins. *Blood* 55: 1033, 1980.
4. Ascensao J, Pahwa R, Kagan W et al: Aplastic anaemia: evidence for an immunological mechanism. *Lancet* 1: 669, 1976.
5. Atkins RC, Ford WL: Early cellular events in a systemic graft versus host reaction. I. The migration of responding and nonresponding donor lymphocytes. *J Exp Med* 141: 664, 1975.
6. August CS, King E, Githens JH et al: Establishment of erythropoiesis following bone marrow transplantation in a patient with congenital hypoplastic anemia (Diamond-Blackfan syndrome). *Blood* 48: 491, 1976.
7. Bach FH, Albertini RJ, Joo P et al: Bone marrow transplantation in a patient with Wiscott-Aldrich syndrome. *Lancet* 2: 1364, 1968.
8. Biddinson WE, Shaw S: Virus specificity of human influenza virus immune cytotoxic T cells. *J Immunol* 122: 660, 1979.
9. von Bekkum DW: The double barrier in bone marrow transplantation. *Sem Hematol* 11: 325, 1974.
10. Binz H, Wigzell H: Shared idiotypic determinants on B and T lymphocytes reactive against the same antigenic determinants. *J Exp. Med* 142: 197, 1975.
11. Blume KG, Beutler E, Bross KJ et al: Bone-marrow ablation and allogeneic marrow transplantation in acute leukemia. *N Engl J Med* 302: 1041, 1980.
12. von Boehmer H, Hudson L, Sprent J: Collaboration of histoincompatible T and B lymphocytes using cells from tetraparental bone marrow chimeras. *J Exp Med* 142: 989, 1975.
13. Bortin MM: A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* 9: 571, 1970.
14. Bortin MM, Rimm AA: Severe combined immunodeficiency disease. Characterization of the disease and results of transplantation. *JAMA* 238: 591, 1977.
15. Borzy M, Hong R, Horowitz SD et al: Fatal lymphoma after transplantation of cultured thymus in children with combined immunodeficiency disease. *N Engl J Med* 301: 565, 1979.
16. Buckley RH, Whismani JK, Schiff RI et al: Correction of severe combined immunodeficiency by fetal liver cells. *N Engl J Med* 294: 1076, 1976.
17. Cleveland WW, Fogel BJ, Brown WT et al: Foetal thymic transplant in a case of Di George's syndrome. *Lancet* 2: 1211, 1968.
18. Clift RA, Hansen ED, Thomas ED: Marrow transplantation from donors other than HLA-identical siblings. *Transplantation* 28: 235, 1981.
19. Datta SK, Schwartz RS: Autoinmunization and graft versus host reactions. *Transpl Rev* 31: 44, 1976.
20. Dicke KA, Lotzova E, Spitzer G, McCredie KB: Immunobiology of bone marrow transplantation. *Sem Hematol* 15: 263, 1978.
21. Dooren LJ, Kamphuis RP, de Koning J et al: Bone marrow transplantation in children. *Sem Hematol* 11: 369, 1974.
22. Dupont B, Good RA (eds): Immunobiology of bone marrow transplantation. Grune & Stratton, New York, 1976.
23. Elkins WL: Cellular immunology and the pathogenesis of graft versus host reactions. *Prog Allergy* 15: 78, 1971.
24. Fefer A, Einstein AB Jr, Cheever MA: Adoptive chemoimmunotherapy of cancer in animals: a review of results, principles and problems. *Ann N Y Acad Sci* 277: 492, 1976.
25. Fialkow PJ, Thomas ED, Bryant JI, Neiman PE: Leukaemic transformation of engrafted human marrow cells in vivo. *Lancet* 1: 251, 1971.
26. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DWH, et al: Cytological identification of radiation chimaeras. *Nature* 177: 452, 1956.

27. Ford WL, Simmond SJ, Atkins RC: Early cellular events in a sqstemic graft versus host reaction. II. Autoradiographic estimates of the frequency of donor lymphocytes which respond to each Ag-B determined antigenic complex. *J Exp Med* 141: 681, 1975.
28. Freireich EJ: Can we afford to treat leukemia? (Editorial). *N Engl J Med* 302: 1084, 1980.
29. Gale RP: Clinical trials of bone marrow transplantation in leukemia. *In* Biology of bone marrow transplantation. Gale RP, Fox CF (eds), Academic Press, New York, 1980, p 7.
30. Gatti RA, Allen HD, Meuwissen HJ, et al: Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 2: 1366, 1968.
31. Githens JH: Immunologic reconstitution with fetal tissue. *N Engl J Med* 294: 1116, 1976.
32. Githens JH, Fulginiti VA, Suvatta V, et al: Grafting of fetal thymus and hematopoietic tissue in infants with immune deficiency syndromes. *Transplantation* 15: 427, 1973.
33. Gluckman E, Devergie A, Sohier J, et al: Graft-versus-host disease in recipients of syngeneic bone marrow. *Lancet* 1: 253, 1980.
34. Gossett TC, Gale RP, Fleischman H, et al: Immunoblastic sarcoma in donor cells after bone-marrow transplantation. *N Engl J Med* 300: 904, 1979.
35. Gratwohl A, Osterwalder B, Ruggero D, et al: Prophylaxis of graft-versus-host disease with cyclosporin A. *Blut* 41: 180, 1980.
36. Grossbard EB, O'Reilly RJ: Bone marrow transplantation in the treatment of leukemia. *Clinical Bull* 10: 109, 1980.
37. Gupta S, Good RA: Markers of human lymphocyte subpopulations in primary immunodeficiency and lymphoproliferative disorders. *Sem Hematol* 17: 1, 1980.
38. Hansen JA, Clift RA, Thomas ED: Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia. *N Engl J Med* 303: 565, 1980.
39. Hellström KE, Hellström I: Lymphocyte-mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. *Adv Immunol* 18: 209, 1974.
40. Hellström KE, Hellström I: The role of serum factors ('blocking antibodies') as mediators of immunological non-reactivity to cellular antigens. *In* Ontogeny of Acquired Immunity, A Ciba Foundation Symposium, Elsevier, Amsterdam, 1972, p 133.
41. Hong R, Schulte-Wissermann H, Horowitz SD, et al: Cultured thymic epithelium (CTE) in severe combined immunodeficiency. *Transplant Proc* 10: 201, 1978 .
42. Hong R, Schulte-Wissermann H, Jarrett-Toth E, et al: Transplantation of culture thymic fragments. II. Results in nude mice. *J Exp Med* 149: 398, 1979.
43. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, et al: The role of the spleen in radiation injury and recovery. *J Lab Clin Med* 35: 746, 1950.
44. Jacobson LO: Evidence for a humoral factor (or factors) concerned in recovery from radiation injury: a review. *Cancer Res* 12: 315, 1952.
45. Jeannet M, Speck B, Sartorius J: Donor selection for bone-marrow transplantation. Predictive value of DR typing for mixed lymphocyte culture compatibility between unrelated individuals. *Transplantation* 26: 448, 1978.
46. Jerne NK: The immune septum: a web of V-domains. Harvey Lecture, 1975.
47. Johnson PR, Hersey P: Anti-leukaemia activity as a bystander effect of graft-versus-host reactions. *Br J Cancer* 33: 370, 1976.
48. Kay HEM, Powles RL, Lawler SD, Clink HM: Cost of bone-marrow transplants in acute myeloid leukaemia. *Lancet* 1: 1067, 1980.
49. Keightley RG, Lawton AR, Cooper MD, et al: Successful fetal liver transplantation in a child with severe combined immunodeficiency. *Lancet* 2: 850, 1975.
50. Klein J: The mayor histocompatibility complex of the mouse. *Science* 203: 516, 1979.
51. Laguens RP, Colmerauer MEM, Segal A, Pasqualini CD: Antigenic differences between AKR lymphoma and thymus cells leading to the detection of a tumor antigen associated with immunological enhancement. *Int J Cancer* 21: 779, 1978.
52. Lorenz E, Uphoff D, Reif TR, et al: Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 12: 197, 1951.
53. Löwenberg B: Fetal liver transplantation: Alternative? *In* Biology of bone marrow transplantation. Gale RP, Fox CF (eds), Academic Press, New York, 1980, p 417.
54. Martin R, Pasqualini CD: Cáncer y trasplante renal. *Medicina (Bs Aires)* 39: 665, 1979.
55. Mathé G, Jammet H, Pendic B, et al: Transfusions et greffes de moelle osseuse homologue chez des humains irradiés a hautes doses accidentellement. *Rev Fr Etudes Clin Biol* 4: 226, 1959.
56. Mathé G, Schwarzenberg L, Amiel AL, et al: Experimental basis and clinical results of leukemia adoptive immunotherapy. Resent results. *Cancer Res* 30: 76, 1970.
57. Nowell PC, Cole LJ, Habermeyer JG, et al: Growth and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice. *Cancer Res* 16: 258, 1956.
58. Odom LF, August CS, Githens JH, et al: Remission of relapsed leukaemia during a graft-versus-host reaction. A "graft-versus-leukaemia reaction" in man. *Lancet* 2: 537, 1978.
60. Pasqualini CD: Virus oncogénicos asociados a linfomas en primates, incluyendo el hombre. *Sangre* 25: 567, 1980.
61. Pasqualini CD, Laguens RP, Colmerauer MEM, Segal A: ¿Por qué crece un tumor? *Medicina (Bs Aires)* 34: 659, 1974.
62. Pasqualini CD, Matusevich M: Correlación entre el crecimiento tumoral y el crecimiento fetal. *Medicina (Bs Aires)* 39: 531, 1979.

63. Piazzon I: Chronic antigenic stimulation in mice leading to graft versus host disease, autoimmunity and leukemogenesis (en prensa).
64. Powles RL, Clink HM, Spence D, et al: Cyclosporin A to prevent GvH disease in man after allogeneic bone-marrow transplantation. *Lancet* 1: 327, 1980.
65. Powles RL, Morgenstern G, Clink HM, et al: The place of bone-marrow transplantation in acute myelogenous leukemia. *Lancet* 1: 1047, 1980.
66. Rachelefsky GS, Stiehm ER, Amman AJ, et al: T-cell reconstitution by thymus transplantation and transfer factor in severe combined immunodeficiency. *Pediatrics* 55: 114, 1975.
67. Rappeport J, Mihm M, Reinherz E, et al: Acute graft-versus-host disease in recipients of bone marrow transplantation from identical twins. *Lancet* 2: 717, 1979.
68. Reinherz EL, Parkman R, Rappeport J, et al: Aberrations of suppressor T cells in human graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 300: 1061, 1979.
69. Reinherz EL, Schlossman SF: Regulation of the immune response. Inducer and suppressor T-lymphocyte subsets in human beings. *N Engl J Med* 303: 370, 1980.
70. Reisner Y, Kapoor N, O'Reilly RJ, Good RA: Allogeneic bone marrow transplantation using stem cells fractionated by lectins: VI. In vitro analysis of human and monkey bone marrow cells fractionated by sheep red blood cells and soybean agglutinin. *Lancet* 2: 1320, 1980.
71. Rumma J, Davis DJ, Caudri MN: Effect of graft versus host reaction on inhibition of tumor growth in vivo and on tumor cytotoxicity in vitro. *Cancer Res* 37: 1389, 1977.
72. Sánchez RS, Cordova MA, Labardini JR, et al: Transplante de médula ósea en anemia aplástica. Reporte del primer transplante en México. *Rev Invest Clin (Méx)* 32: 49, 1980.
73. Sorensen RU: Transplante de médula ósea en anemia aplástica. *En* El glóbulo rojo y sus alteraciones. Daiber A, Editorial Andrés Bello, Santiago, Chile, 1980, p 317.
74. Steinmuller D: Lymphoid target cell replacement and refractoriness to graft-versus-host disease. *Transplantation* 30: 313, 1980.
75. Storb R, Thomas ED, Buckner CD, et al: Marrow transplantation in thirty "untransfused" patients with severe aplastic anemia. *Ann Intern Med* 92: 30, 1980.
76. Streilen JW, Stone MJ, Duncan WR: Studies on the specificity of autoantibodies produced in systemic graft-versus-host disease. *J Immunol* 114: 255, 1975.
77. Strober S, Slavin S, Gottlieb M, et al: Allograft tolerance after total lymphoid irradiation. *Immunol Rev* 46: 86, 1979.
78. Thomas ED, Bryant JI, Buckner CD, et al: Leukemic transformation of engrafted human marrow. *Transpl Proc* 4: 567, 1972.
79. Thomas ED, Bryant JI, Buckner CD, et al: Leukaemic transformation of engrafted human marrow cells in vivo. *Lancet* 1: 1310, 1972.
80. Thomas ED, Buckner CD, Basaji M, et al: One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation and allogeneic marrow transplantation. *Blood* 49: 511, 1977.
81. Thomas ED, Buckner CD, Clift RA, et al: Marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia in first remission. *N Engl J Med* 301: 597, 1979.
82. Thomas ED, Buckner CD, Fefer A, et al: Marrow transplantation in the treatment of acute leukemia. *Adv Cancer Res* 27: 269, 1978.
83. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, et al: Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 257: 491, 1957.
84. Thomas ED, Sanders JE, Flournoy N, et al: Marrow transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia in remission. *Blood* 54: 468, 1979.
85. Thomas ED, Storb R, Clift RA, et al: Bone-marrow transplantation. *N Engl J Med* 292: 832 & 895, 1975.
86. Vos O, Davids JAG, Weyzen WWH, et al: Evidence for the cellular hypothesis in radiation protection by bone marrow cells. *Acta Physiol Pharmacol* 4: 482, 1956.
87. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, et al: Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic marrow grafts. *N Engl J Med* 300: 1068, 1979.
88. Winston DJ, Gale RP, Meyer DV, et al: Infectious complications of human bone marrow transplantation. *Medicine* 58: 1, 1979.
89. Zinkernagel RM, Callahan GN, Althage A, et al: On the thymus in the differentiation of the "H-2 self-recognition" by T cells: Evidence for dual recognition? *J Exp Med* 147: 882, 1978.
90. Zinkernagel RM, Doherty PC: Restriction of in vitro T-cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248: 701, 1974.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 244-256 (1981)

EFECTOS DE PEPTIDOS CEREBRALES, HIPOTALAMICOS E HIPOFISARIOS SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL *

ANA MARIA COMARU - SCHALLY, A. V. SCHALLY

Veterans Administration Medical Center, New Orleans, LA, U.S.A.

Desde hace más de una década se conoce el hecho que los péptidos hipotalámicos ejercen acciones en otras zonas del cerebro además del hipotálamo. Puesto que la presencia de la hipófisis no es necesaria para que estos efectos se pongan de manifiesto, los mismos se conocen como efectos extra-pituitarios de las hormonas hipotalámicas. Para distinguirlos de acciones producidas por ciertas hormonas hipotalámicas como la somatostatina en otras regiones del organismo además del cerebro, se emplea frecuentemente la denominación de efectos extra-endocrinos [43, 47, 49]. Esta nueva nomenclatura enfatiza el hecho que los péptidos de origen hipotalámico son capaces de ejercer también acciones específicas sobre el sistema nervioso central [41, 43, 47, 49, 64]. En este artículo se considerarán los efectos extra-endocrinos de las hormonas hipotalámicas y de otros péptidos aislados a partir del cerebro, sobre el sistema nervioso central así como también algunos de los efectos clínicos endocrinos de las hormonas hipotalámicas.

MSH (Hormona melanocito-estimulante)

Si bien tanto Kastin en nuestro laboratorio [42-49] como de Wied y col. [19] demostraron que la MSH ejerce un efecto directo sobre el cerebro, arribaron a esta conclusión a través de caminos conceptuales diferentes. De Wied y col., estaban interesados en determinar la secuencia de aminoácidos que dentro de la molécula del ACTH era la responsable de producir sus efectos centrales y supusieron que la ACTH y la MSH compartían información redundante. Nosotros junto con Kastin, pensamos desde un comienzo que la MSH por sí misma ejercía un efecto peculiar sobre el sistema nervioso central [101].

A partir de 1966 se llevaron a cabo una serie de estudios para demostrar sus efectos [44]. Tanto en ratas [87], anfibios [17] como en seres humanos [44], se encontraron cambios electroencefalográficos luego de la administración de MSH o de sus fragmentos. Los cambios producidos en el EEG de hombres normales por la administración de ACTH o α-MSH 4-10 se caracterizaron por una persistencia del bloqueo del ritmo α [88, 89].

Numerosas investigaciones clínicas realizadas con MSH en animales y seres humanos arrojaron resultados consistentes con la hipótesis que la MSH estimula el procesamiento de la información por un efecto sobre la atención más que sobre la memoria clásica. Individuos normales y enfermos mentales mostraron una mejoría en la adquisición de información y una disminución de la ansiedad. Estos efectos se pusieron muy claramente de manifiesto cuando se empleó la prueba de retención visual de Benton [5, 19, 22, 45-47, 64, 86-89]. A pesar de los numerosos estudios realizados

Recibido: 10-XII-1980. Aceptado: 7-I-1981.

* Presentado a modo de Conferencia en el Primer Simposio Internacional de Neuroendocrinología, Buenos Aires, setiembre 1980.

Dirección postal: Veterans Administration Medical Center, 1601 Perdido Street, New Orleans, LA 70146, U.S.A.

con la MSH, su mecanismo de acción permanece aún desconocido, si bien existe evidencia que sugiere que una elevación de los niveles de AMP cíclico en el cerebro puede participar en este proceso.

MIF (factor inhibidor de la liberación de hormona melanocito-estimulante)

Estudios preliminares realizados con la MSH sugirieron que este péptido agravaba los síntomas de la enfermedad de Parkinson. En 1966, junto con Kastin demostramos que las fenotiazinas, compuestos que poseen efectos sobre el sistema extrapiramidal, producen una liberación de MSH [47, 49, 51]. En un estudio subsiguiente que realizamos en un intento por investigar la actividad anti-Parkinsoniana del MIF (el factor inhibidor de la liberación de la MSH) empleando la potenciación con Dopa, observamos que el MIF era capaz de contrarrestar los temblores inducidos por oxotremorina mientras que la administración del MIF por vía oral podía revertir la sedación producida por la reserpina [74-76]. Utilizamos en ese estudio animales hipofisectomizados ya que queríamos también investigar una posible acción directa del MIF sobre el sistema nervioso central. En este sistema el MIF fue activo y la presencia de la hipófisis no fue necesaria para producir sus efectos [43, 46, 47, 49, 51, 74]. Esta constituyó la primera prueba clara que una hormona hipotalámica es capaz de ejercer efectos extraendocrinos. Estas observaciones fueron más tarde confirmadas por numerosos autores. Posteriormente demostramos mediante la prueba de potenciación con Dopa [73, 74] que la actividad del MIF en el cerebro no se altera como consecuencia de manipulaciones endocrinas como la adrenalectomía, castración, pinealectomía, tiroidectomía, nefrectomía o timectomía. Este estudio indicó además que estas glándulas no son necesarias para que el MIF ejerza sus acciones [101].

El tripéptido Pro-Leu-Gly-NH_2 (Fig. 1) ha sido denominado MIF-I porque aun se desconoce si el mismo representa o no la hormona fisiológica inhibidora de la MSH; el empleo de esta terminología nos permite distinguirlo de otros MIFs [43, 69, 92].

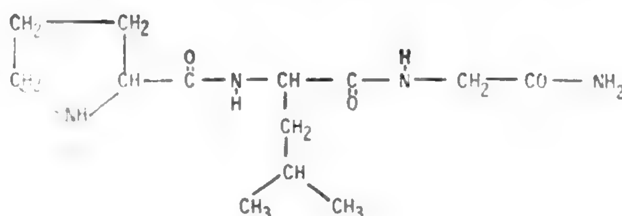


Fig. 1. — Estructura del MIF.

Se ha demostrado que el MIF-I afecta la atención y el aprendizaje, siendo también capaz de disminuir los síntomas de la depresión [23, 43]. Estudios clínicos realizados con el MIF-I demostraron que esta hormona es capaz de disminuir los síntomas de la enfermedad de Parkinson [2-4, 26, 31]. Se probó también que este péptido reduce en forma significativa los síntomas de la enfermedad de Parkinson en los pacientes que no han sido tratados con Dopa. En quienes reciben este tratamiento, el MIF-I potencia los efectos benéficos de la Dopa pero no sus acciones colaterales. Barbeau, uno de los pioneros en el tratamiento del Parkinson con Dopa, demostró que la mejoría observada en los pacientes con enfermedad de Parkinson que recibían MIF fue mayor que cuando se administraba Dopa solamente. Tampoco se observaron efectos colaterales cuando se asociaba el MIF a la Dopa y esta combinación disminuía las disquinesias producidas por la Dopa [2-4, 32].

No se comprende aún en su intimidad el mecanismo por el cual el MIF ejerce estos efectos si bien una de las explicaciones probables parece ser el aumento de la síntesis de la dopamina. Resulta necesaria la realización de estudios de toxicología del MIF y sus análogos antes que este tipo de tratamiento se vuelva rutinario.

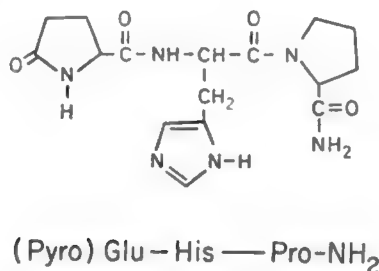
Se ha demostrado que el MIF es menos potente cuando es administrado por vía oral que cuando se lo inyecta por vía sistémica, razón que ha impulsado a la investigación de análogos del péptido con una potencia mayor y una acción más duradera que la del propio MIF. En años recientes se han sintetizado varios de estos análogos [6, 91]. Estos péptidos incluyen: H-

Pro-isobutil Gly-Gly-NH_2 y los estereoisómeros de dos péptidos H-Pro-N-Me-Leu-Gly (LL) y (LD) y Pro-N-Me-Leu-Ala-NH_2 (LLD) y (LDD).

Algunos de estos análogos ejercen una mayor actividad neurofarmacológica sobre el sistema nervioso central [91], siendo capaces de disminuir la catalepsia inducida por flufenazina en la rata, potenciando la respuesta a la Dopa en ratas tratadas con pargilina. Uno de esos análogos como la p-Glu-Leu-Gly dimetilamida inhiben el temblor inducido por la oxotremorina, siendo este análogo 29 veces más activo que el MIF [6].

TRH (hormona liberadora de tirotrofina)

El tripéptido TRH (Fig. 2) fue la primera hormona aislada del hipotálamo. Luego se demostró que es capaz de liberar TSH (tirotrofina) y prolactina de la hipófisis anterior, ejerciendo efectos sobre el sistema nervioso central [10, 11, 27, 68, 91, 94]. Entre ellos se puede mencionar la modificación de la actividad motora espontánea, la modificación de los patrones normales de sueño, la producción de anorexia, la inhibición del reflejo condicionado de escape, la rotación en el sentido cabeza-cola. La TRH se opone y contrarresta la acción de los barbitúricos durante el sueño, la hipotermia y los estados letales, oponiéndose además a la acción del etanol, el hidrato de cloral, la clorpromazina y el diazepam durante el sueño y la hipotermia. Aumenta el período de convulsión y la letalidad de la estricnina así como la actividad motora en animales tratados con morfina. Potencia los efectos producidos por la combinación Dopa-pargilina y parece ser capaz de reducir los trastornos de comportamiento en el hombre. Inhibe a nivel central la secreción de



(Pyro) Glu – His —— Pro-NH_2

Fig. 2. — Estructura de la TRH.

la hormona de crecimiento y de la prolactina mediada por la morfina. Altera la actividad eléctrica en las membranas celulares del cerebro. Aumenta el tiempo de síntesis y liberación de la norepinefrina o acelera el *turnover* de la amina, liberándola junto con la dopamina de preparaciones de sinaptosomas, acelerando también la desaparición de norepinefrina de las terminaciones nerviosas. Finalmente, se ha demostrado que la TRH potencia la acción excitatoria inducida por la acetilcolina en las neuronas de la corteza cerebral.

Las observaciones que demostraban que la triiodotironina (T3) y la TRH podían potenciar los efectos de la imipramina en pacientes con depresión mental, impulsaron a la investigación de los efectos de este tripéptido en el sistema nervioso central [83]. Los estudios demostraron que la TRH potencia centralmente los efectos de la prueba de la Dopa en animales intactos, hipofisectomizados o tiroidectomizados. Estos hallazgos demostraron que la TRH era efectiva directamente a nivel central sin depender de la hipófisis (TSH) o la tiroides (T3 y T4) [79]. A diferencia del MIF, la TRH no fue capaz de reducir los síntomas producidos por la oxotremorina.

Los primeros estudios clínicos realizados con TRH [50, 82] fueron promisorios y sugirieron que el tripéptido podía tener alguna actividad antidepresiva [24, 67, 107]. Algunos de quienes investigan estos problemas han postulado que podrían existir subgrupos de pacientes con depresión que responden a la TRH o que al menos muestran una importante mejoría en ciertos componentes del comportamiento como la motivación y el interés [24, 28]. Kastin y col. enfatizan el posible valor diagnóstico de la TRH en la depresión ya que permitiría clasificar grados de depresión mental [24]. En una serie de investigaciones realizadas en animales, la TRH demostró poseer una acción estimulante general frente al etanol y los barbitúricos [12, 81, 82].

La obtención de anticuerpos contra TRH en 1974, permitió la localización anatómica de este tripéptido en otras zonas del cerebro además del hipotálamo. La actividad antidepresiva de la TRH en diversos animales que no puede atribuirse a sus

acciones sobre el eje hipófiso-tiroideo, sugiere que la TRH podría actuar directamente sobre el cerebro y la médula espinal. Este posible papel de la TRH como neurotransmisor en el sistema nervioso central resulta apoyado por el hallazgo de concentraciones significativas del péptido en zonas del cerebro extrahipotalámicas en diversos animales como la rata, la gallina, anfibios y peces como el salmón [12, 91]. Se han sintetizado ya análogos de TRH con una mayor actividad sobre el sistema nervioso central [14, 91] si bien aun estas sustancias no han sido ensayadas en pacientes con depresión mental.

Somatostatina

La somatostatina es un tetradecapéptido que ejerce múltiples acciones endocrinas y extra-endocrinas (Fig. 3), [12, 40, 73, 78, 91]. En términos generales se puede afirmar que la somatostatina reduce la actividad de los siguientes procesos no-endocrinos: vaciamiento gástrico, secreción de pepsina y ácido gástrico, secreción de enzimas pancreáticas y bicarbonato, absorción de xilosa y de triglicéridos, contracción de la vesícula biliar, flujo sanguíneo en el bazo, la dosis letal 50 de pentobarbital, la liberación de acetilcolina en las terminaciones nerviosas y en general la actividad eléctrica del sistema nervioso central.

Fig. 3. — Estructura de la somatostatina.

Aunque resulta obvia la posibilidad que los péptidos hipotalámicos actúen en el proceso de la neurotransmisión [12, 40, 73, 78], la misma fue postulada teóricamente en base a los efectos de la somatostatina durante la prueba de la potenciación con Dopa. Otros estudios demostraron que los efectos de la somatostatina son en general opuestos a los de la TRH en lo que se refiere a la sedación y la hipotermia producida por el pentobarbital, como así también en las contracciones producidas por la estricnina. La somatostatina potencia la sedación producida por el pentobarbital en ratones e inhibe las convulsiones producidas por la estricnina [40, 49]. Disminuye además la liberación de acetilcolina por parte de las terminaciones nerviosas y la actividad del sistema nervioso central.

Vasopresina

Esta hormona es sintetizada principalmente por los núcleos supraópticos y actúa en el metabolismo hídrico del organismo, modificando el tono del músculo liso de los vasos sanguíneos.

Los trabajos de De Wied y col. [18, 19, 22] han aportado evidencias que señalan la participación de la vasopresina y sus análogos en el proceso de la memoria. Estos investigadores observaron que las ratas privadas de neurohipófisis olvidan rápidamente mientras que la inyección de vasopresina normaliza ese déficit. El mismo grupo de investigadores estudiando una cepa de ratas (Brattleboro) que carecen de la capacidad de sintetizar vasopresina y que muestran déficits de memoria, demostró que estos síntomas se podían revertir inyectando 1 μg de desglicinamida-lisina-8-vasopresina. Los resultados de estas investigaciones han llevado a postular que la vasopresina desempeña un papel importante en el mecanismo de la memoria [18, 19, 22, 105].

ACTH

Entre las hormonas hipofisarias la ACTH fue la que recibió mayor atención en lo que respecta a la posibilidad de ejercer efectos sobre el sistema nervioso central. De Wied y col. [18, 22] fueron los pioneros de la hipótesis que la ACTH o sus análogos ejercen efectos en la adquisición y el mantenimiento de ciertos procesos de comportamiento. Estos investigadores observaron que el tratamiento con ACTH o sus análogos restaura ciertos déficits del aprendizaje observados en ratas hipofisectomizadas tanto en las conductas de evitamiento activas y pasivas. Estos efectos no son mediados por las hormonas de la corteza adrenal [18, 22].

LH-RH y análogos (hormona liberadora de gonadotrofinas)

La LH-RH es una hormona que libera LH y FSH de la hipófisis. Se trata de un decapéptido [61, 62, 90, 91, 93] (Fig. 4). Ha re-

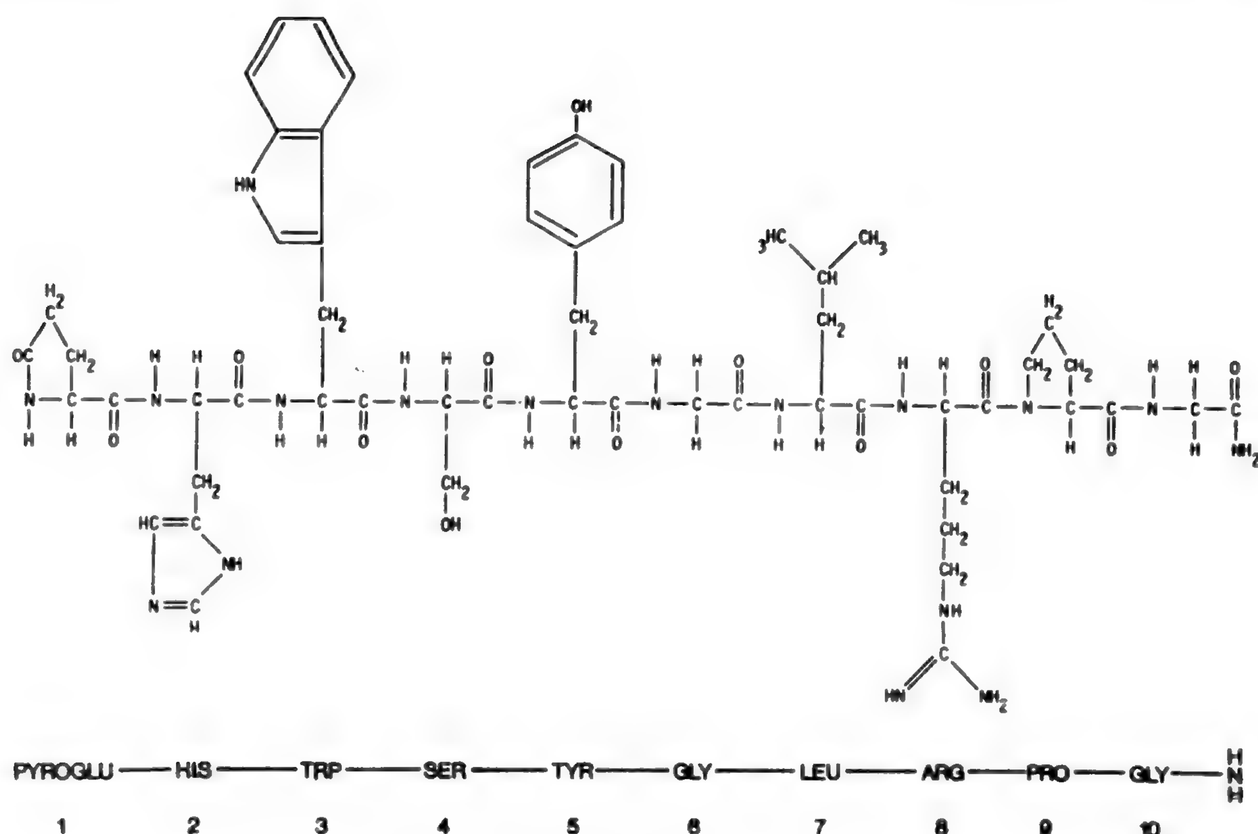


Fig. 4. — Estructura de la LH-RH.

sultado posible sintetizar análogos de LH-RH superactivos y de acción prolongada como por ejemplo. D-Trp-6-LHRH, D-Ala-6-LH-RH Etilamida (Fig. 5) y D-Leu-6-LH-RH Etilamida [16, 91].

Fig. 5. — Estructura de D-Ala6-LH-RH EA.

Se han descripto varias actividades extraendocrinas de la LH-RH [34, 47, 49, 73, 80]. Sawyer y col. observaron que la administración de LH-RH a animales mediante inyección subcutánea produce alteraciones electrofisiológicas que persisten muchas horas después de concluida la administración [53].

La capacidad de la LH-RH para aumentar la actividad copulatoria en ratas normales hipofisectomizadas u ovariectomizadas ha despertado el interés de numerosos investigadores [66, 72]. A pesar que parece difícil la aplicación de estos estudios realizados en animales a los seres humanos, la importancia del problema ha hecho que se continúen realizando numerosos estudios clínicos en este sentido. En 1974 Mortimer y col.[65] trataron a 12 hombres con hipogonadismo hipogonadotrófico durante un año empleando inyecciones subcutáneas de LH-RH (500 μg cada 8 horas). Todos los pacientes tenían niveles circulantes de gonadotrofinas muy bajos o no detectables. Los autores observaron un incremento de la líbido en estos pacientes al cabo de los primeros 7 a 14 días de tratamiento, no relacionado con los niveles aun bajos de andrógenos circulantes. Esto sugiere que la LH-RH puede ejercer un efecto directo sobre el sistema nervioso central además de su acción sobre la hipófisis [65]. Tanto Aparicio, como Schwarzstein y col. [1, 95] también observaron un aumento de la líbido en pacientes oligospérmicos tratados con LH-RH. Estudios doble ciego empleando 500 μg de LH-RH o placebo por vía subcutánea cada 8 horas durante 4 semanas en 10 hombres con impotencia sexual secundaria, mostraron una evidente mejoría especialmente en lo que respecta a la aparición de erecciones espontáneas durante el tratamiento [43].

En 1976 comunicamos los resultados de dos estudios preliminares realizados en hombres y mujeres con disminución de la líbido. En el primer estudio, 6 hombres y 1 mujer recibieron 700 μg de LH-RH en

solución salina por vía endovenosa diariamente durante 3 días, 2 semanas consecutivas. En este estudio sólo un hombre experimentó un claro aumento de la líbido y la potencia durante el período que recibió LH-RH[43]. En el segundo grupo, 3 hombres recibieron LH-RH en dosis elevadas (1.25 mg a 3 mg) por vía endovenosa diariamente durante 3 días consecutivos en un período de 1-3 semanas, no observándose en este grupo ninguna mejoría. En el tercer estudio, 2 de 8 pacientes mejoraron después de la administración de 6 mg por día de LH-RH[43].

Si bien los resultados de estos estudios no fueron estadísticamente concluyentes, las investigaciones sobre este posible efecto beneficioso del LH-RH o de sus análogos agonistas en el tratamiento de ciertos casos de impotencia sexual, deben sin duda continuar.

Existen estudios preliminares que señalan que el LH-RH o sus análogos superactivos son agentes de importancia clínica para el tratamiento de ciertos casos de depresión mental. García y col.[29] y Pires de Oliveira[70] han comunicado efectos favorables del LH-RH en el tratamiento de pacientes con depresión mental empleando la escala de Hamilton. Recientemente los Dres. Allen German y Stampfer de la Universidad de Western Australia han publicado los resultados del tratamiento con LH-RH en una serie de pacientes con síntomas de depresión mental[30]. Los autores describen una extraordinaria y sorprendente respuesta al LH-RH en 8 pacientes con stress asociado a depresión. Los síntomas desaparecieron 12 a 48 horas después de una sola inyección de 500 μg de LH-RH por vía intramuscular, retornando estos pacientes a sus actividades normales. Un estudio similar realizado en pacientes con enfermedad afectiva primaria (clasificación de la psiquiatría británica), mostró que el LH-RH carece de valor[30]. Los 27 pacientes estudiados experimentaron una mejoría del insomnio en la noche siguiente a la inyección del LH-RH. Estos autores concluyen que el LH-RH puede ser notablemente efectivo para tratar ciertos casos de depresión mental especialmente los debidos a stress prolongado y agotamiento[30].

En estudios que hemos realizado, si bien no doble-ciego, hemos podido confirmar el hecho que el LH-RH o sus análogos[16, 91] son agentes de importancia clínica para tratar ciertos casos de depresión mental. Sin embargo, sólo después de un cuidadoso análisis de los resultados de varios estudios clínicos doble-ciego, será posible llegar a una conclusión final acerca de la efectividad de este péptido y sus análogos en el tratamiento de la depresión.

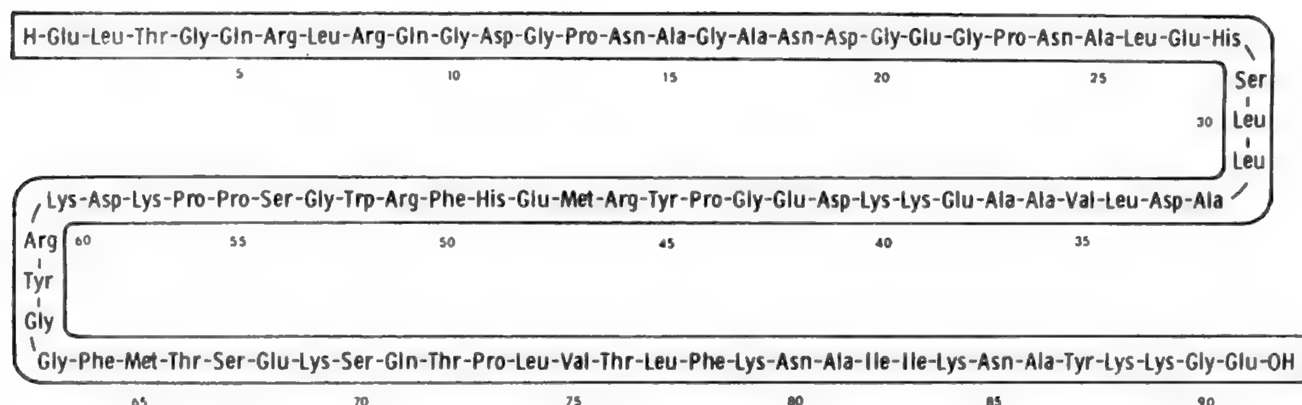
Otros péptidos activos en el sistema nervioso central.

Muchos otros péptidos hallados en el cerebro han demostrado poseer efectos sobre el sistema nervioso central, algunos de ellos inclusive luego de su administración periférica como por ejemplo la sustancia P, el péptido delta inductor del sueño y un hexapéptido que inhibe la analgesia. Es posible que otros péptidos conocidos e inclusive algunos hasta hoy desconocidos, ejerzan acciones sobre el sistema nervioso central.

Encefalinas y endorfinas

El efecto específico y potente de ciertas hormonas peptídicas sobre el sistema nervioso central es conocido desde hace tiempo e inclusive ha sido empleado en terapéutica. Sin embargo, recién en la última década se demostró que ciertas hormonas peptídicas ejercen sus acciones primarias exclusivamente en el cerebro. El descubrimiento que el cerebro contiene receptores para la morfina derivada de la amapola, condujo a la búsqueda de compuestos naturales o mensajeros cerebrales que tuvieran la capacidad de unirse a esos receptores[33, 71, 96–100, 103, 104]. Varios grupos de investigadores trabajando independientemente aislaron e identificaron esas sustancias como pertenecientes al grupo de los péptidos y las denominaron encefalinas y endorfinas[38, 57–59, 96, 97]. Estas sustancias son segmentos de una larga cadena peptídica compuesta de 91 aminoácidos denominada beta-lipotropina. Esta larga cadena de 91 aminoácidos fue descubierta en 1964 por C.H. Li[56] (Fig. 6).

Los siguientes son los segmentos de la beta-lipotropina que se han aislado a par-



Methionine Enkephalin = 61-65 β-Endorphin = 61-91 β-MSH = 41-58

α-Endorphin = 61-76

γ-Endorphin = 61-77

Fig. 6. — Estructura de beta-lipotropina, beta-endorfina, encefalina y otros péptidos: Met-enkephalin: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met; PRO-Met-enkephalin: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg; α-neo-endorphin: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Arg - - - Arg; Leu-enkephalin: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu; Dynorphin (1-13): Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys.

tir de la hipófisis: beta-MSH que es el fragmento comprendido entre los aminoácidos 41 a 58; beta-endorfina, la porción de la cadena con mayor actividad cerebral, constituido por 31 aminoácidos localizada entre los sitios 61 a 91; alfa-endorfina, un fragmento activo que consta de 16 aminoácidos comprendidos entre las posiciones 61 a 76 [59]; gamma-endorfina localizada entre los aminoácidos 61 a 77 y la metionina-encefalina, correspondiente a la secuencia de aminoácidos comprendida entre 61 y 65 de la cadena de lipotropina [54, 56]. Existe también otra encefalina que posee una leucina en lugar de la metionina y que se conoce como leucina-encefalina [38, 97] (Fig. 6). Recientemente hemos aislado en nuestro laboratorio un hexapéptido al que denominamos pro-metionina-encefalina [37] (Fig. 6). Esta neuroencefalina, aislada del hipotálamo de cerdo, posee la siguiente secuencia de amiácidos: H - Tyr - Gly - Gly - Fen - Met - Arg - OH. Es importante destacar que este péptido no es un fragmento ni de la beta-lipotropina porcina ni de la beta-endorfina y puede constituir un precursor de la met-encefalina. Estos estudios sugieren la existencia de péptidos de cadena larga que son precursores de la met-encefalina y que posiblemente estén relacionados con la alfa-neo-endorfina [39]. Esta pro-metionina-encefalina sintética demostró poseer una importante actividad opiácea en estudios in vivo [37]. Otro potente precursor de la leu-encefalina fue aislado recientemente por Goldstein y col. [34] y se conoce como dinorfina.

Las encefalinas están localizadas en forma específica en áreas del cerebro que a su vez son ricas en receptores para opiáceos [7, 8]. Estas neuronas están concentradas en zonas del cerebro que median la percepción para el dolor, el comportamiento emocional y otras funciones alteradas por opiáceos [96, 98, 100, 104]. La beta-endorfina, otro de los péptidos opiáceos, está localizada en la hipófisis, de la que puede ser liberada a la circulación, pudiendo actuar en los órganos periféricos. En el cerebro, la beta-endorfina se encuentra concentrada en el hipotálamo [7, 96, 98, 100].

Estudios realizados en animales mediante la inyección intraventricular de beta-endorfina demostraron que esa sustancia produce una profunda analgesia que se mantiene durante varias horas, un efecto dos veces más potente que el de la morfina cuando se analiza en base a

pesos moleculares de la dosis administrada. La beta-endorfina también produce una caída en la temperatura corporal y, dependiendo de la dosis empleada, causa catalepsia y catatonía [13, 53, 54, 58, 60, 77].

Estudios en la depresión mental y la esquizofrenia: Tanto la beta-endorfina como el ACTH se segregan a partir de la hipófisis en respuesta al stress agudo, mientras que en el suero de individuos normales no se detectan niveles de beta-endorfina significativos. Los investigadores que trabajan en este campo como Kline, Terenius y otros han sugerido que los pacientes con depresión mental tienen un déficit de beta-endorfina, si bien la posible naturaleza de la relación entre beta-endorfina y el stress permanece aún en el terreno de la hipótesis [25, 36, 52, 85, 104].

Una serie de estudios preliminares en los que se administró 10 mg de beta-endorfina a pacientes esquizofrénicos, deprimidos o afectados de neurosis obsesivo-compulsiva, demostraron que esta sustancia es capaz de disminuir en forma drástica los síntomas de estos pacientes [52, 55]. Pero debido al hecho que estos estudios no fueron realizados en condiciones de doble-ciego, estos resultados deben ser interpretados con mucha cautela. Otros investigadores no pudieron confirmar estos datos con posterioridad. Por otro lado, Gunne y col. [36] postularon que en la esquizofrenia hay un exceso de beta-endorfina y no un déficit como se sostenía previamente y por ese motivo han tratado de administrar una sustancia con actividad anti-endorfina, el antagonista denominado naloxona, a pacientes esquizofrénicos. Los resultados de este estudio con naloxona fueron alentadores ya que los pacientes mostraron una mejoría acentuada de sus síntomas, observándose una reducción de las alucinaciones en 4 de 6 esquizofrénicos. Estos hallazgos fueron después confirmados por Emrich y col. [25] empleando un diseño doble-ciego, pero otros investigadores no pudieron confirmar tales hallazgos. Vale decir que en el momento actual existe un conjunto de teorías conflictivas para tratar de explicar el papel que cumple la beta-endorfina en la esquizofrenia [25, 36, 52, 55, 85, 104].

En base a los estudios realizados en animales, se postuló que la endorfina y particularmente su análogo (Des-Tyr)-gamma-endorfina que no es opiáceo, poseen actividad neuroléptica [20, 21]. Estudios realizados con este análogo desprovisto de actividad opiácea en 14 pacientes [106] esquizofrénicos crónicos con períodos de recaída o con psicosis esquizoafectiva resistentes a la terapéutica convencional con neurolépticos, arrojaron resultados prometedores. Los pacientes fueron divididos en dos grupos. En el primero se reunieron pacientes que recibían solamente este análogo como tratamiento, administrado por vía intramuscular durante 7 días consecutivos. En el segundo grupo, cuyo diseño fue doble-ciego, los pacientes recibieron neurolépticos e inyecciones de análogos. En ambos grupos se observó una mejoría temporaria o semipermanente, disminuyendo los síntomas de psicosis y aun desapareciendo durante el tratamiento. No se describió ningún efecto tóxico. Estos resultados beneficiosos pueden ser debidos a una normalización de la homeostasis de la beta-endorfina en el cerebro [106].

Análogos de encefalinas

Cuando se administran preparaciones de encefalina a animales de experimentación por vía intraventricular, se produce una analgesia de breve duración que puede ser inhibida o bloqueada por naloxona [15, 108]. Como la encefalina es rápidamente degradada por enzimas presentes en los tejidos animales, diversos grupos de investigación han sintetizado análogos de la encefalina que pueden atravesar la barrera hematoencefálica y con posible utilidad terapéutica [15, 108]. La sustitución de la glicina en posición 2 por la D-alanina o la D-metionina inhibe la degradación de la encefalina. En nuestro laboratorio hemos sintetizado la D-Ala2-Met-encefalina que es 10 a 100 veces más potente que la misma encefalina [15, 108]. La administración de este análogo a ratas por vía intraventricular produjo una analgesia en la prueba del *tail-flick*, 30 veces superior a la producida por la Met-encefalina y de mayor duración. Estos efectos son inhibidos por la

naloxona [15, 108]. Los químicos del laboratorio Sandoz en Suiza, han sintetizado un análogo que es 30 000 veces más potente que la Met-encefalina [48]. Este compuesto consiste en la inclusión de D-alanina en la posición 2, un grupo metilo añadido a la fenilalanina en posición 4 y una modificación de la estructura de la metionina en posición 5. Este análogo es activo por vía endovenosa y oral. Por la primera resulta varias veces más potente que la morfina en su acción analgésica [84]. A pesar que este análogo de la encefalina parece ser promisorio como agente terapéutico en el tratamiento del dolor, produce adición y dependencia cuando se administra en forma repetida a los animales. La encefalina sintética y sus análogos sintetizados recientemente así como la beta-endorfina, producen tolerancia y dependencia física cuando se administran en forma crónica a los animales de experimentación [84, 102].

La conducción de las informaciones en las células nerviosas desde el axón hacia sus terminaciones se produce a través de la propagación de una onda de movimientos iónicos. Los axones se ramifican y forman un gran número de terminaciones nerviosas que establecen contacto con dendritas de otras neuronas [98, 99, 104]. Los neurotransmisores son las sustancias químicas liberadas por las terminaciones nerviosas y que difunden a través de la sinapsis influyendo en la respuesta de las neuronas vecinas. Los neurotransmisores actúan en sitios receptores altamente específicos, que son proteínas localizadas en las membranas neuronales cuyas propiedades son semejantes a las de los receptores a los opiáceos. Si la encefalina se libera próxima a la sinapsis, se fija a su receptor específico y de esta manera impide que el neurotransmisor se una a su receptor. De esta manera el mensaje resulta bloqueado, especialmente en el caso de los neurotransmisores que intervienen en la transmisión de información de dolor y emoción. Hay estudios que demuestran que el efecto inhibidor de los opiáceos está relacionado con modificaciones de la permeabilidad de sodio a nivel de la sinapsis [98, 99, 104].

Acupuntura y adición

Estudios experimentales realizados en animales han demostrado que los efectos analgésicos de la acupuntura desaparecen cuando los animales son hipofisectomizados o cuando se administra naloxona. Estos resultados sugirieron que los efectos analgésicos observados durante la acupuntura se deben a la liberación de encefalina o beta-endorfina [98, 104].

La beta-endorfina parece desempeñar también un papel importante en la adición y dependencia a los narcóticos, habiéndose sugerido que una deficiencia genética de endorfina puede predisponer a algunos individuos a desarrollar una adición a opiáceos [98, 104]. Inyecciones repetidas a animales de beta-endorfina o encefalina causan síntomas de dependencia física y tolerancia [9, 20, 21]. A pesar que algunos investigadores conservan esperanzas que será posible sintetizar análogos de endorfinas libres de efectos colaterales como la dependencia física, Goldstein y otros sostienen que si un compuesto actúa como morfina, causará dependencia.

De ser posible la síntesis de sustancias químicas que no causen dependencia y que se fijen a receptores opiáceos, sería posible bloquear sensaciones dolorosas de cualquier origen, incluyendo el dolor experimentado por los adictos a la heroína después de la privación de la droga [98, 104].

En conclusión, se puede decir que diversos estudios realizados tanto por nuestro grupo como por otros investigadores han demostrado que numerosos péptidos hallados en el hipotálamo, otras áreas del cerebro y la hipófisis, ejercen acciones sobre el sistema nervioso central y la conducta. Las hormonas peptídicas hipotalámicas poseen efectos extra-endocrinos sobre el sistema nervioso central y la conducta además de sus acciones regulatorias de la liberación de las hormonas hipofisarias. Los estudios de esas sustancias y sus análogos contribuyen a aumentar nuestra comprensión de la bioquímica, la conducta, las enfermedades mentales, la analgesia y la adición. El desarrollo de nuevos agentes sobre la base de estas investigaciones podría contribuir a un mejor tra-

tamiento del dolor, la depresión mental, la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson y el alcoholismo.

Bibliografía

1. Aparicio NJ, Schwarzstein L, Turner EA, Turner D, Mancini R, Schally AV: Treatment of oligopathic normogonadotropic oligoosthenospermia with synthetic luteinizing hormone-releasing hormone. *Fertil Steril* 27: 549, 1976.
2. Barbeau A: Potentiation of levodopa effect by intravenous 1-prolyl-1-leucyl-glycine amide in man. *Lancet* 2: 683, 1975.
3. Barbeau A, Kastin AJ: Polypeptide therapy in Parkinson's disease. *In:* Advances in parkinsonism, W. Birkmayer, O. Hornykeiwicz (eds) *Roche*, Basle, 1976, p 483.
4. Barbeau A, Roy M, Kastin AJ: Double-blind evaluation of oral 1-prolyl-leucyl-glycine amide in Parkinson's disease. *Can Med Ass J* 114: 120, 1976.
5. Beckwith BE, Sandman CA, Hothersall D, Kastin AJ: The influence of 3 short chain peptides (α-MSH, MSH/ACTH 4-10, MIF-1) on dimensional attention. *Pharmac Biochem Behav* 5 (Suppl 1): 11, 1976.
6. Bjorkanon S, Castensson S, Sievertsson H: Tripeptide analogues of melanocyte-stimulating hormone release-inhibiting hormone (Pro-Leu-Gly-NH_2) as inhibitors of oxotremorine-induced tremor. *J Med Chem* 22: 931, 1979.
7. Bloom F, Battenberg E, Rossier J, Ling N, Guillemin R: Neurons containing β-endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: immunocytochemical studies. *Proc Natl Acad Sci* 75: 1591, 1978.
8. Bloom F, Battenberg E, Rossier J, Ling N, Leppaluoto J, Vargo TM, Guillemin R: Endorphins are located in the intermediate and anterior lobes of the pituitary gland, not in the neurohypophysis. *Life Sci* 20: 43, 1977.
9. Bloom F, Segal D, Ling N, Guillemin R: Endorphins: profound behavioral effects in rats suggest new etiological factors in mental illness. *Science* 194: 630, 1976.
10. Boler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers C Y, Schally AV: The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidine-proline amide. *Biochem Biophys Res Comm* 37: 705, 1969.
11. Bowers CY, Schally AV, Enzmann F, Boler J, Folkers K: Porcine thyrotropin releasing hormone is (Pyro)Glu-His-Pro (NH_2). *Endocrinology* 86: 1143, 1970.
12. Brown M, Vale W: Central nervous system effects of hypothalamic peptides. *Endocrinology* 96: 1333, 1975.
13. Cox BM, Goldstein A, Li CS: Opiod activity of a peptide, β-lipotropin-(61-91), derived from β-lipotropin. *Proc Natl Acad Sci* 73: 1821, 1976.
14. Coy DH, Hirotsu Y, Redding TW, Coy EJ, Schally AV: Synthesis and biological properties of the [2-L-β-(parazolyl-1)alanine]-analogs of luteinizing hormone-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. *J Med Chem* 18: 948, 1975.
15. Coy DH, Kastin AJ, Schally AV, Morin O, Caron NG, Labrie F, Walker JM, Fertel R, Berntson GG, Sandman CA: Synthesis and opioid activities of stereoisomers and other D-amino acid analogs of methionine-enkephalin. *Biochem Biophys Res Comm* 73: 632, 1976.
16. Coy DH, Vilchez-Martínez JA, Coy EJ, Schally AV: Analogs of luteinizing hormone-releasing hormone with increased biological activity produced by D-amino acid substitutions in position 6. *J Med Chem* 19: 423, 1976.
17. Denman PM, Miller LH, Sandman CA, Schally AV, Kastin AJ: Electrophysiological correlates of melanocyte-stimulating hormone activity in the frog. *J Comp Physiol Psychol* 80: 59, 1972.
18. De Wied D: Peptides and behavior. Mini-review. *Life Sci* 20: 195, 1977.
19. De Wied D, Bohus B: Long term and short effects on retention of a conditioned avoidance response in rats by treatment with long acting pitressin and α-MSH. *Nature* 213: 1484, 1966.
20. De Wied D, Bohus B, Van Ree JM, Kovacs GL, Greven HM: Neuroleptic-like activity of [des-Tyr^1]-α-endorphin in rats. *Lancet* 1: 1046, 1978.
21. De Wied D, Kovacs GL, Bohus B, Van Ree JM, Greven HM: Neuroleptic activity of the neuropeptide β-LPH_{62-77}. *European J Pharm* 49: 427, 1978.
22. De Wied D, Versteeg DHG: Neurohypophysial principles and memory. *Fed Proc* 35: 2348, 1979.
23. Ehrensing RH, Kastin AJ: Melanocyte-stimulating hormone release inhibiting hormone as an antidepressant. *Arch Gen Psych* 30: 63, 1974.
24. Ehrensing RH, Kastin AJ, Schalehdon S, Friesen HG, Vargas JR, Schally AV: Affective state and thyrotropin-releasing hormone in depressed patients. *Am J Psych* 131: 6, 1974.
25. Emrich HM, Cording C, Piree S, Kolling A, Uzerssen D, Hertz A: Indication of an antipsychotic action of the opiate antagonist naloxone. *Pharmakopsychiatr Neuropsychopharmakol* 10: 265, 1977.
26. Fisher P, Schneider E, Jacobi P, Maxion H: Effect of melanocyte-stimulating hormone release inhibiting hormone (MIF) in Parkinson's syndrome. *Exp Neurol* 12: 360, 1975.
27. Folkers K, Enzmann F, Boler J, Bowers CY, Schally AV: Discovery of modification of the synthetic tripeptide-sequence of the thyrotropin releasing hormone having activity. *Biochem Biophys Res Comm* 37: 123, 1969.

28. Furlong FW, Brown GM, Beeching MF: Thyrotropin-releasing hormone: Differential antidepressant and endocrinological effects. *Am J Psych* 133: 1187, 1976.
29. García JA, Moreira MS, Camacho GC: Tratamento das depressois pelos decapeptideos hipotalamicos. *F Medica* (BR) 74: 1977.
30. German GA, Stampfer HG: Hypothalamic releasing factor for reactive depression. *Lancet* 1: 789, 1979.
31. Gerstenbrand VJ, Binder H, Kozma C, Pusch S, Reisner T: Infusiontherapie mit MIF (melanocyte-inhibiting factor) beim Parkinson. *Wien Klin Wochenschr* 87: 822.
32. Gerstenbrand VJ, Poewe W, Archner F, Kozma C: Clinical utilization of MIF-I. *In:* Central nervous system effects of hypothalamic hormones and other peptides, edited by Collu, R., Barbeau, A., Ducharme, J.R. Rochefort, J. G. (eds) Raven Press, 1979, p 415.
33. Goldstein A: Opioid peptides (endorphins) in pituitary and brain. *Science* 193: 1081, 1976.
34. Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L: Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci* 76: 6666, 1979.
35. Guillemin R: The endocrinology of the neuron and the neural origin of endocrine cells. *In:* Hypothalamic peptide hormones and pituitary regulation, Porter JC (eds), Plenum Press 1977, p 1.
36. Gunne LM, Lindstrom L, Terenius L: Naloxone-induced reversal of schizophrenic hallucinations. *J Neural Transm* 40: 13, 1977.
37. Huang WY, Chang RCC, Kastin AJ, Coy DH, Schally AV: Isolation and Structure of PRO-Methionine-enkephalin: Potential enkephalin precursor from porcine hypothalami. *Proc Natl Acad Sci* 76: 7177, 1979.
38. Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR: Identification of two related pentapeptides from brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 579, 1975.
39. Kangawa K, Matsuo H: α-Neu-endorphin: a big Leu-enkephalin with potent opiate activity from porcine hypothalami. *Bioch Bioph Comm* 86: 153, 1979.
40. Kastin AJ, Coy DH, Jacquet Y, Schally A V, Plotnikoff NP: CNS effects of somatostatin. *Metabolism* 27: 1247, 1978.
41. Kastin AJ, Coy DH, Schally AV, Miller LH: Peripheral administration of hypothalamic peptides results in CNS changes. *Pharm Res Comm* 10: 293, 1978.
42. Kastin AJ, Dempsey GL, Leblanc V, Dryster-AAS K, Schally AV: Extinction of an appetitive operant response after administration of MSH. *Hormones and Behavior* 5: 135, 1974.
43. Kastin A, Ehrensing RH, Coy DH, Schally AV, Kostrzewa RM: Behavioral effects of brain peptides, including LH-RH. *In:* Psychoneuroendocrinology in reproduction, Zichella L, Poncheri P (eds), Elsevier/North-Holland, 1979, p 79.
44. Kastin AJ, Kullander S, Borglin NE, Dyster-AAS K, Dahlberg B, Ingvar D, Krakau CET, Miller MC, Bowers CY, Schally AV: Extra pigmentary effects of MSH in amenorrheic women. *Lancet* 1: 1007, 1968.
45. Kastin AJ, Miller LH, González-Barcena D, Hawley WD, Dyster-AAS K, Schally AV, Velasco-Parra ML, Velasco M: Psychophysiologic correlates of MSH activity in man. *Physiol Behav* 7: 893, 1971.
46. Kastin AJ, Miller LH, Nockton R, Sandman CA, Schally AV, Stratton LO: Behavioral aspects of melanocyte-stimulating hormone (MSH). *In:* Progress in brain Research, Zimmermann E, Gispen WH, Marks BH, de Wied D (eds), Elsevier Scientific Publishing Co, Amsterdam, 1973, p 468.
47. Kastin AJ, Miller LH, Sandman CA, Schally AV, Plotnikoff NP: CNS and pituitary effects of hypothalamic peptides and MSH. *In:* Essays in neurochemistry and neuropharmacology, Youdim MBH, Lovenberg DF, Sharman DF, Lagnado JR (eds), John Wiley & Sons, London, 1977, p 139.
48. Kastin AJ, Nissen C, Nikolics K, Medzihradezhy K, Coy DH, Schially AV: Distribution of ^{3}H-α-MSH in rat brain. *Brain Res Bull* 1: 19, 1976.
49. Kastin AJ, Olson R, Schally AV, Coy DH: Minireview: CNS effects of peripherally administered brain peptides. *Life Sci* 25: 401, 1979.
50. Kastin AJ, Schalchdon S, Ehrensing RH, Anderson MS: Improvement in mental depression with decreased thyrotropin response after administration of thyrotropin-releasing hormone. *Lancet* 1: 740, 1972.
51. Kastin AJ, Schally AV: MSH activity in pituitaries of rats with hypothalamic extracts from various animals. *Gen Comp Endocr* 8: 344, 1967.
52. Kline NS, Li CH, Lehmann HE, Laytha A, Laski E, Cooper T: β-endorphin-induced changes in schizophrenic and depressed patients. *Arch Gen Psych* 34: 1111, 1967.
53. Koranyl L, Whitmoyer DI, Sawyer CH: Effect of thyrotropin-releasing hormone, luteinizing hormone-releasing hormone, and somatostatin on neuronal activity of brain stem reticular formation and hippocampus in the female rat. *Experimental Neurology* 57: 807, 1977.
54. Lazarus LH, Ling N, Guillemin R: β-lipotropin as a prohormone for the morphinomimetic peptides, endorphins and enkephalins. *Proc Natl Acad Sci* 73: 2156, 1976.
55. Lehmann H, Vasavan Nair NP, Kline NS: β-endorphin and naloxone in psychiatric patients: clinical and biological effects. *Am J Psych* 136: 6, 1979.
56. Li CH: Lipotropin, a new active peptide from pituitary glands. *Nature* 201: 924, 1964.
57. Li CH, Chung D: Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate acti-

vity from camel pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci* 73: 1145, 1976.
58. Li CH, Yamashiro O, Tseng LF, Loh HH: Synthesis and analgesic activity of human β-endorphin. *J Med Chem* 20: 325, 1977.
59. Ling N, Burgus R, Guillemin R: Isolation, primary structure and synthesis of α-endorphin and γ-endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphomimetic activity. *Proc Natl Acad Sci* 73: 3942, 1976.
60. Loh HH, Tseng LF, Wei E, Li CH: β-endorphin is a potent analgesic agen. *Proc Natl Acad Sci* 73: 2895, 1976.
61. Matsuo H, Arimura A, Nair RMG, Schally AV: Synthesis of the porcine LH- and FSH-releasing hormone by the solid-phase method. *Biochem Biophys Res Comm* 45: 822, 1971.
62. Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Arimura A, Schally AV: Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Comm* 43: 1334, 1971.
63. Meglio M, Hosobuchi Y, Loh HH, Adams JE, Li CH: β-endorphin: behavioral and analgesic activity in cats. *Proc Natl Acad Sci* 74: 774, 1977.
64. Miller LH, Kastin AJ, Sandman CA, Fink M, Van Veen WJ: Polypeptide influence on attention, memory and anxiety in man. *Pharmac Biochem Behav* 2: 663, 1974.
65. Mortimer CH, Mc Neilly AS, Fisher RA, Murray, Besser MA: GM gonadotrophin-releasing hormone therapy in hypogonadal males with hypothalamic or pituitary dysfunction. *Br Med J* 4: 617, 1974.
66. Moss RL, Mc Cann SM: Induction of mating behavior in rats by luteinizing-releasing factor. *Science* 181: 177, 1973.
67. Mountjoy CQ, Neller M, Hall R, Price JS, Hunter P, Dewar JH: A double-blind crossover sequestrial trial of oral thyrotrophin-releasing hormone in depressing. *Lancet* 1: 958, 1974.
68. Nair RMG, Barrett JF, Bowers CY, Schally AV: Structure of porcine thyrotropin-releasing hormone. *Biochemistry* 9: 1103, 1970.
69. Nair RMG, Kastin AJ, Schally AV: Isolation and structure of hypothalamic MSH release-inhibiting hormone. *Biochem Biophys Res Comm* 43: 1376, 1971.
70. Oliveira PRS: Estudo da aeao do LH-RH no tratamento das defunoes. *F Medica* (BR) 70: 1, 1979.
71. Pert CB, Snyder SH: Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179: 1011, 1973.
72. Pfoff DN: Luteinizing hormone releasing factor potentiates lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized rats. *Science* 182: 1148, 1973.
73. Plotnikoff NP, Kastin AJ: Neuropharmacology of hypothalamic releasing factors. *Biochem Pharmac* 25: 363, 1976.
74. Plotnikoff NP, Kastin AJ, Anderson MS, Schally AV: DOPA potentiation by a hypothalamic factor, release-inhibiting hormone (MIF). *Life Sci* 10: 1279, 1971.
75. Plotnikoff NP, Kastin AJ, Anderson MS, Schally AV: Oxotremorine antagonism by a hypothalamic hormone, melanocyte-stimulating hormone release-inhibiting factor, MIF. *Proc Soc Exp Biol Med* 140: 811, 1972.
76. Plotnikoff NP, Kastin AJ, Anderson MS, Schally AV: Deserpidine antagonism by a tripeptide, 1 - prolyl - 1 - leycylglycinamide. *Neuroendocrinology* 11: 67, 1973.
77. Plotnikoff NP, Kastin AJ, Coy DH, Christensen CW, Schally AV, Spirtes MA: Neuropharmacological actions of enkephalin after systemic administration. *Life Sci* 19: 1283, 1976.
78. Plotnikoff NP, Kastin AJ, Schally AV: Growth hormone release inhibiting hormone: neuropharmacological studies. *Pharmac Biochem Behav* 2: 693, 1974.
79. Plotnikoff NP, Prange AJ, Breese GR, Wilson JC: Thyrotropin releasing hormone: enhancement of DOPA activity in thyroidectomized rats. *Life Sci* 14: 1271, 1974.
80. Plotnikoff NP, White WF, Kastin AJ, Schally AV: Gonadotropin releasing hormone (GnRH): neuropharmacological studies. *Life Sci* 17: 1685, 1975.
81. Prange AJ, Breese GR, Cott JM, Martin BR, Cooper BR, Wilson IC, Plotnikoff NP: Thyrotropin releasing hormone: antagonism of pentobarbital in rodents. *Life Sci* 14: 447, 1974.
82. Prange AJ, Breese GR, Jahnke GD, Martin BR, Cooper BR, Cott HM, Wilson IC, Alltop LB, Lipton MA, Bissette G, Nemeroff CB, Loosen PT: Modification of pentobarbital effects by natural and synthetic polypeptides: dissociation of brain and pituitary effects. *Life Sci* 16: 1907, 1975.
83. Prange AJ, Wilson IC, Knox AE, Meclane TK, Breese GR, Martin BR, Alltop LB, Lipton MA: Enhancement of imipramine by thyroid-stimulating hormone: clinical and theorical implications. *Am J Psych* 127: 191, 1970.
84. Romer D, Buescher HH, Hill RC, Pless J, Bauer W, Cardinaux F, Closse A, Hauser D, Huguenin R: A synthetic enkephalin analogue with prolonged parenteral and oral analgesic activity. *Nature* 268: 547, 1977.
85. Ross M, Berger PA, Goldstein A: Plasma β-endorphin immunoreactivity in schizophrenia. *Science* 14: 1163, 1979.
86. Sandman CA, Alexander WD, Kastin AJ: Neuroendocrine influences on visual discrimination and reversal learning in the albino and hooded rat. *Physiol Behav* 11: 613, 1973.
87. Sandman CA, Denman PM, Miller LH, Knott JR, Schally AV, Kastin AJ: Electroencephalographic measures of melanocyte-stimulating hormone activity. *J Comp Physiol Psych* 76: 103, 1971.
88. Sandman CA, George J, Nolan J, Van Riezen H, Kastin AJ: Enhancement of atten-

tion in man with ACTH/MSH 4-10. *Physiol Behav* 15: 427, 1975.
89. Sandman CA, George J. Walker R, Nolan JD, Kastin AJ: The neuropeptide MSH/ACTH 4-10 enhances attention in the mentally retarded. *Pharmac Biochem Behav* 5 (Suppl 1): 23, 1976.
90. Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RMG, Debeljuk L, White WF: The gonadotropin-releasing hormone; one polypeptide regulates the secretion of luteinizing and follicle stimulating hormone. *Science* 173: 1036, 1971.
91. Schally AV, Coy DH, Meyers CA: Hypothalamic regulatory hormones. *Ann Rev Biochem* 47: 89, 1978.
92. Schally AV, Kastin AJ: Purification of a bovine hypothalamic factor which elevates pituitary MSH levels in rats. *Endocrinology* 79: 768, 1966.
93. Schally AV, Nair RMG, Redding TW, Arimura A: Isolation of the LH and FSH-releasing hormone from porcine hypothalami. *J Biol Chem* 246: 7230, 1971.
94. Schally AV, Redding TW, Bowers CY, Barrett JF: Isolation and properties of porcine thyrotropin releasing hormone. *J. Biol Chem* 244: 4077, 1969.
95. Schwarzstein L, Aparicio NJ, Turner D, Calamera JC, Mancini JF, Schally AV: Use of synthetic luteinizing hormone-releasing hormone in treatment of oligospermia in men: a preliminary report. *Fert Steril* 23: 331, 1975.
96. Simantov R, Kuhur MJ, Uhl G, Snyder SH: Opioid peptide enkephalin: immunohistochemical mapping in the rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 74: 2167, 1977.
97. Simantov R, Snyder S: Isolation and structure identification of a morphine-like peptide "enkephatin" in bobine brain. *Life Sci* 18: 781, 1976.
98. Snyder SH: The opiate receptor and morphine-like peptides in the brain. *Am J Psych* 135: 6, 1978.
99. Snyder SH, Pasternak GN, Pert CB: Opiate receptor mechanisms. *In:* Handbook of phsychopharmacology. Iversen, L. L., Iversen, S. D., Snyder, S. H., (eds) Plenum Press, 1975, p 5.
100. Snyder SH, Simantov R: The opiate receptor and opioid peptides. *J Neurochem* 28: 13, 1977.
101. Stratton LO, Kastin AJ: Increased acquisition of a complex competitive task after MSH and MIF. *Pharmac Biochem Behav* 3: 901, 1975.
102. Stubbs WA, Jones A, Edwards CRW, Delitala G, Jeffcoate WJ, Ratter SJ: Hormonal and metabolic responses to an enkephalin analogue in normal man. *Lancet* 1: 1225, 1978.
103. Terenius L: Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fractions from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol* 33: 377, 1973.
104. Terenius L: Endogenous peptides and analgesia. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 18: 189, 1978.
105. Van Wimersma TJ, De Wied D: Dorsal hippocampus-a site of action of neuropeptides on avoidance behavior? *Pharmac Biochem Behav* 5 (Suppl 1): 29, 1976.
106. Verhoeven WMA, Von Praag HM, Von Ree JM, De Wied D: Improvement of schizophrenic patients treated with [Des-Tyr[1]]-α-endorphin (DTαE). *Arch Gen Psych* 36: 294, 1979.
107. Vogel HP. Benkert O, Illig R, Müller-Oerlinghausen B, Poppenberg A: Psychoendocrinological and therapeutic effects of TRH in depression. *Acta Psych Scand* 56: 223, 1977.
108. Walker JM, Berntson GG, Sandman CA, Coy DH, Schally AV, Kastin AJ: An analog of enkephalin having prolonged opiate-like effects in vivo. *Science* 196: 85, 1977.

— — — —

The view that there is no new things under the sun is, in a way, involved in the original meaning of the word "evolution": to evolve means to enroll; and evolution meant originally the unrolling of what is there already: what is there, preformed, is to be made manifest (to develop, similarly, means to unfold what is there).

La opinión de que no hay nada nuevo bajo el sol está, en cierto sentido, involucrada en el significado original de la palabra "evolución": evolucionar significa desenvolver; y evolución significó originariamente el desenvolvimiento de lo que ya está: lo que está allí, preformado, se hará manifiesto (desarrollar, similarmente, significa desplegar lo que está ahí).

KARL POPPER

The Self and its Brain, 1977

MEDICINA

FUNDADA EN 1939

PUBLICACION BIMESTRAL

(Registro de Propiedad Intelectual Nº 1.051.984)

MEDICINA no tiene propósitos comerciales. El objeto de su creación ha sido propender al adelanto de la medicina argentina. Los beneficios que pudieran obtenerse serán aplicados exclusivamente a este fin

Publicada con el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

EDITORIALES

La batalla de Valmy y la medicina

Cuenta Borges en "El pudor de la historia" que Johann Wolfgang Goethe en el año 1792 había acompañado al duque de Weimar a un viaje a París lo que le permitió observar el desarrollo de la batalla de Valmy. Goethe en una de sus frases memorables dijo "en este lugar y en el día de hoy se abre una época en la historia del mundo y podemos decir que hemos asistido a su origen".

Esto era cierto también por otros motivos pues ese mismo día, el 20 de septiembre de 1792, y esto no lo dice Borges, la Convención Nacional reunida en París abolía la monarquía y proclamaba la república. Goethe, que estaba adscripto al comando en jefe del ejército austroprusiano, el duque de Brunswick, escribió después "Campaña en Francia de 1792". Cuenta Goethe la depresión que la noche después de la derrota tenían los oficiales del ejército que descontaban una fácil victoria sobre un enemigo sin condiciones militares aquilatadas. Fue entonces que le preguntaron a Goethe a qué atribuía el inesperado resultado y él pronunció la frase que citamos al comienzo.

En un viejo *Surgery, Gynecology and Obstetrics* del año 1952, Rudolf Marx detalla desde un punto de vista médico, las causas del desastre del ejército austroprusiano, ejército que estaba formado por mercenarios pero que tenía un impresionante historial de eficiencia militar y que en acciones previas a Valmy había dispersado fácilmente a las vanguardias del ejército francés, tomado dos plazas fuertes sin mayor esfuerzo y parecía tener abierto el camino a París. Por otra parte el ejército francés, aunque muchos de sus soldados pertenecían a los ejércitos del antiguo régimen, carecían de oficiales y suboficiales con experiencia. Hasta 4 semanas antes de Valmy, este ejército lo comandaba el Marqués de Lafayette quien había tenido que huir pues se lo iba a arrestar como contrarrevolucionario. Los jefes que le sucedieron, du Doumouriez y Kellerman eran semidesconocidos. A 250 kilómetros de París, en la llanura de Valmy, en la Champagne, se encontraron los ejércitos. Apenas dispersada la niebla de la mañana empezó un cañoneo continuado. Al comenzar la tarde la infantería prusiana, crema de los ejércitos de la época, inició en perfecto orden y lentamente el avance hacia las líneas francesas. Estas no retrocedieron y contestaron al fuego. Al poco tiempo se detuvo el ataque y la infantería prusiana se replegó al lugar de salida. Asombrado por este comportamiento, el mismo rey de Prusia tomó en persona el mando e inició un segundo ataque contra esa "miserable canalla parisién". Pero ni el mismo rey pudo despertar a la guardia de su extraño letargo, la cual, luego de breve tiempo se retiró aunque con escasas pérdidas. Los asombrados franceses

no persiguieron a las fuerzas que se retiraban, las cuales quedaron aproximadamente en las cercanías de Valmy durante 10 días para luego retroceder al Rin sin nuevas luchas.

Los historiadores tejieron ulteriormente una serie de leyendas que explicarían la derrota. Desde que la lluvia había dejado sin vituallas al ejército hasta que el propio Duque de Brunswick no había querido luchar contra un ex camarada como era el general Doumouriez; todas resultaron teorías sin fundamento. Otros como Goethe, atribuyeron a las nuevas ideas, al patriotismo de los soldados ciudadanos, las razones de la victoria. En cierto sentido, pero con criterio estrictamente militar, poco tiempo después Napoleón ponía en marcha un instrumento que resultaba invencible para los estereotipados ejércitos mercenarios del siglo XVIII. Los que recordamos lo que fueron los dos primeros años de la segunda guerra mundial, tenemos cierto escepticismo respecto a que buenas razones, patriotismo, la ética de su lado, triunfen contra una superior preparación militar. Si no fuera así tendríamos que haber pensado que los ejércitos nazis eran los patriotas y virtuosos. Un viejo proverbio español es muy adecuado al respecto y dice "y vinieron los sarracenos y nos molieron a palos, que Dios ayuda a los malos cuando son más que los buenos". Es una hipocresía cuando no abierta inmoralidad recurrir a que se tiene la ética o la razón de su lado para justificar la victoria.

Pero, ¿qué ocurrió en Valmy que nos de una información verdadera? Según Rudolf Marx, el ejército austroprusiano tuvo que cruzar por "L'Argonne" región con pocos recursos, las lluvias anegaron los lugares con buena agua y el ejército semihambriento se alimentó mal, bebía agua de pozos y zanjas polucionadas, y mojado y con frío, marchaba sin entusiasmo. Además, se produjeron casos aislados de diarreas graves desde hacía algunas semanas. Cuando el ejército austroprusiano llegó a la Champagne, encontró los famosos viñedos pero aún con uvas verdes, lo que no fue óbice para que todos los soldados engulleran grandes cantidades de ellas. La noche anterior a la batalla aparece una terrible epidemia de "disentería roja" posiblemente una disentería bacilar por las materias fecales y mucus hemorrágico. Se entiende fácilmente el estado de debilidad que produce una epidemia de este tipo y el "extraño letargo" de la infantería prusiana. Que la epidemia fue grave lo prueba que sólo 2/3 del ejército austroprusiano llegó al Rin. El resto murió en la retirada, pero no por bayonetas francesas.

La frase de Goethe se realizó. Las *Shigellae* permitieron que nuevos ánimos se infundieran en el ejército del pueblo francés y le dio confianza en sí mismo. Aparte, tiempo para prepararse y consolidarse. La infinita complejidad de la realidad permite algunas veces que una visión poética de la misma se inmortalice.

A. LANARI

Hepatitis post-transfusión debida al virus no A no B

La hepatitis viral es una de las complicaciones más serias luego de realizada una transfusión sanguínea. Se cree que alrededor del 8 % de los individuos transfundidos desarrollan lo que se denomina hepatitis post-transfusión. Esta enfermedad queda definida cuando se observan dos o más elevaciones consecutivas de la enzima transaminasa glutámico pirúvica (TGP) en un período entre 14 a 180 días luego de haber recibido sangre o algunos de sus derivados y en ausencia de otra causa que la explique, como ser insuficiencia cardíaca, alcohol, drogas que simulan hepatitis, etc. Por lo menos una de estas elevaciones debe ser tres veces mayor que el límite superior del valor normal de esta enzima.

Con el descubrimiento del antígeno australiano, actualmente denominado antígeno de superficie (HBc Ag), por Blumberg y col. (*JAMA* 191: 541, 1965) y de su asociación específica con la hepatitis viral por Prince (*Proc Natl Acad Sc* 60: 814, 1968) y con la posterior introducción de diferentes métodos de rutina para la detección de este antígeno en todas las unidades de sangre en los EE. UU., se pensó que la hepatitis post-transfusional sería pronto una cosa del pasado. Pero no fue así, en los EE. UU. siguió observándose que el 10 % de las personas que recibían transfusiones sanguíneas desarrollaban un cuadro de hepatitis. Este hecho dio lugar a nuevas investigaciones. Al comienzo se postuló que estos casos eran debidos al virus A o al virus B que no podían ser serológicamente detectados debido a la insensibilidad de los métodos utilizados. Sin embargo, la identificación del antígeno y anticuerpo del virus A por Feistone y col. (*Science* 182: 1026, 1973) y el desarrollo de métodos denominados de tercera generación, altamente sensibles y específicos en la investigación del antígeno de superficie del virus B (HBs Ag) y otros componentes antigénicos del mismo virus (HBc Ag, HBc Ag) aportaron la información necesaria para concluir que por lo menos el 90 % de los casos de hepatitis post-transfusión, no presentaban marcadores serológicos del virus A ni del virus B y eran causados probablemente por otro virus. La primera comunicación implicando la existencia de otro agente fue la de Prince y col. (*Lancet* 2: 241, 1974). La evidencia que existe a favor de que la hepatitis post-transfusión es causada por agentes virales, es entonces indirecta y se basa fundamentalmente en que la enfermedad presenta un período de incubación, una lesión histológica que con la tinción de hematoxilina y eosina es virtualmente indistinguible de la que se observa con las causadas por los virus A o B, y en que ha sido transmitida a animales de experimentación. Esto llevó a denominar a este tipo de enfermedad hepatitis no A no B y, al parecer, serían más de uno los agentes responsables de causarla. Numerosas líneas de investigación sugieren esta posibilidad, entre ellas, la existencia de períodos de incubación variables entre 2 y 26 semanas. Al parecer el período de incubación tiene dos picos, uno muy corto entre 2 y 4 semanas, y otro largo, entre 8 y 12 semanas; esto sugiere la existencia de dos agentes diferentes. El patrón de elevación de las transaminasas hepáticas durante la fase aguda también sugiere esta posibilidad: en algunos casos es monofásica, igual a la que se observa en las causadas por los virus A o B, mientras que en otros es bifásica, con un pequeño incremento inicial seguido por un corto tiempo de latencia y un gran incremento final.

Por otra parte, el Prof. Zuckerman (*Virus and the Liver, Falk Symposium* 28, 1978, p 121) usando inóculos provenientes de diferentes fuentes indujo dos ataques separados de hepatitis en el mismo chimpancé. Purcell y Alter, en su estudio realizado con chimpancés, observaron con la utilización del microscopio electrónico, dos tipos diferentes de lesión hepática no A no B. Todas estas evidencias pueden tener varias explicaciones alternativas, pero la más convincente es que por lo menos dos virus se encuentran implicados en la producción de esta enfermedad y que hasta tanto no sean identificados, no será posible clasificarlos. Por lo menos diez diferentes laboratorios en el mundo han comunicado la identificación de partículas semejantes a virus en el hígado de animales de experimentación o humanos que padecían esta enfermedad. También varios laboratorios han desarrollado métodos para la investigación del antígeno-anticuerpo asociado con el o los virus, pero hasta el momento ninguno ha sido consistente ni específico. La mayoría de los estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que el agente o agentes causales de la denominada hepatitis no A no B se comporta en forma semejante al virus B. Parecería que la mayor parte de los pacientes que desarrollan este

tipo de enfermedad son asintomáticos y anictéricos, lo que hace difícil la identificación de estos casos. A su vez, se está acumulando numerosa evidencia sobre este tipo de hepatitis que produce frecuentemente enfermedad crónica del hígado. En un estudio publicado recientemente por Koretz y col. (*Gastroenterology* 80: 893, 1980) el seguimiento de estos enfermos mostró que la mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos, con poca evidencia clínica de progresión de la enfermedad, pero un gran porcentaje muestra evidencia bioquímica de enfermedad crónica del hígado y algunos pacientes llegaron a la cirrosis hepática en una forma muy lenta y clínicamente inaparente.

En conclusión, la hepatitis no A no B es la responsable del 90 % de los casos de hepatitis post-transfusión en la actualidad; en la mayoría de los casos es asintomática, existiendo portadores crónicos asintomáticos que pueden transmitir la enfermedad. Hasta tanto no se desarrolle un método comercial sensible y eficaz para el hallazgo de los mismos, este tipo de hepatitis no se podrá controlar y seguirá siendo frecuente en los enfermos transfundidos. A su vez, estas investigaciones definirán cuál es la exacta implicancia de estos virus en los casos de hepatitis crónica activa y cirrosis que actualmente se denominan criptogénicas o idiopáticas.

L. A. Viola
I. Barrison
Gastrointestinal Unit Charing Cross Hospital, London.

El experimento de Eichna

El experimento de Eichna consiste en lo siguiente: un viejo médico, al jubilarse, decide vivir nuevamente las peripecias de un estudiante de medicina y repite íntegramente la carrera, 44 años después de graduado la primera vez. Sus desalentadoras conclusiones las presenta el Dr. Ludwig W. Eichna en el *New England Journal of Medicine* [1]. El Dr. Eichna es un distinguido fisiólogo investigador clínico, cardiólogo, educador y "por encima de todo, un médico" como dice un editorial de la misma revista [2], que en el momento de jubilarse en 1975 desempeñaba la jefatura del Departamento de Medicina de la Universidad del Estado de Nueva York (Down State Medical Center, Brooklin). No realizó el experimento para comparar hogaño con antaño, ni a *la búsqueda del tiempo perdido,* sino preocupado por la deficiencia de la enseñanza que a su juicio desvirtúa el propósito de lograr el mejor producto final, esto es, el mejor médico. Su investigación la realizó para sentir el problema desde la posición del estudiante a lo largo de todos sus avatares. Con este fin revive íntegramente el curriculum durante 4 años, aceptado por sus compañeros, casi 50 años menores, como un estudiante más, asistiendo a clases teóricas y prácticas, conferencias y seminarios y sometiéndose a todos los exámenes, pero, eso sí, en completa desvinculación con las autoridades universitarias. En su experimento comprueba deficiencias sustanciales en la educación médica, que atribuye a los responsables de organizarla, que lo hacen según criterios personales, apartándose de las verdaderas necesidades de los educandos, pero con la complicidad de éstos, proclives a seguir la línea del menor esfuerzo.

— — — —

1 Eichna, Ludwig W.: Medical-School Education, 1975-1979: A Student's Perspective. *N. England J. Med.* 303: 727, 1980.

2 Editorial: Medical Education Revisited. *Ibidem* 303: 752, 1980.

Lo vivido en su experiencia, Eichna lo destila en ocho principios que estima debieran constituir las normas de la enseñanza médica. Son los siguientes:

"1. El foco y la primera prioridad de la educación en una escuela médica es el paciente."

"2. La profesión médica es una ciencia humanísticamente conducida."

"3. Aprender es un proceso conceptual de solución de problemas que demanda tiempo."

"4. La educación médica es un continuo que une el colegio secundario y la enseñanza médica propiamente dicha en un todo unificado."

"5. Aprender medicina requiere un adecuado balance entre el aprendizaje práctico y la enseñanza formal en conferencias y seminarios."

"6. La educación médica requiere procedimientos de evaluación que establezcan claramente el progreso y la competencia."

"7. La educación médica debe supeditarse a un stándard de excelencia."

"8. La profesión médica requiere en todos los niveles, incluyendo específicamente el estudiantil, la conducta ética más elevada."

Cada uno de estos principios refleja los aspectos donde comprobó las mayores fallas, descontando los aspectos favorables, cuya exposición no viene al caso. El principio de que el paciente debe ser lo primero, es transgredido por los estudiantes, que no llegan a comprenderlo por carencia de las aptitudes necesarias en ese sentido, o porque no se les enseña. La Escuela contribuye con programas de enseñanza en los que prevalecen los aspectos técnicos, mal coordinados y sujetos a intereses personales. Señala que la medicina debe enseñarse como ciencia y no solamente como un conjunto de técnicas, y que el enfermo resultará tanto más beneficiado, cuanto más se lo enfoque con criterio científico. La reducción y simplificación de la enseñanza de la medicina como ciencia, es bien recibida por los estudiantes, y adoptada sin reservas por las autoridades, que no le asignan el tiempo suficiente y que optan por simplificarla en todo lo posible. Critica la mecanización de la docencia, desviada a la memorización y al uso de apuntes, con escasa reflexión y fragmentada con el objetivo final del examen de cada materia. Lamenta la inconexión entre la enseñanza secundaria y la universitaria, estimando que la primera debiera brindar jóvenes con mejor formación humanística y al mismo tiempo con una base biológica más amplia, y también que desde el colegio debieran valorarse las aptitudes individuales requeridas para ser un buen médico. Desaprueba la orientación excesivamente técnica, con insistencia en números y análisis, en desmedro del razonamiento clínico. Es partidario de los exámenes que permiten valorar los conocimientos y la aptitud para manejarlos y censura los procedimientos de promoción mecanizados aplicados en las escuelas médicas norteamericanas. Hallándose en juego vidas humanas, Eichna estima que toda escuela médica debe aspirar a la mayor excelencia, deplorando el descenso de las exigencias. En los aspectos éticos pone el mayor énfasis, y dice que esto debiera merecer atención ya desde el colegio, en cuanto al estudiante, en cuanto a la Escuela, predicando con el ejemplo de sus responsables, y por parte de la sociedad, modificando el rumbo que cada vez más considera el cuidado de la salud como una transacción comercial, resumiendo su credo con las siguientes palabras: "No somos industriales. No manejamos un negocio. No vendemos un producto a consumidores. Somos médicos. Cuidamos pacientes y nos preocupamos por ellos. Tenemos que ser conscientes del costo, sí, pero el paciente está antes".

El Dr. Eichna piensa que los defectos observados en su segunda carrera no son patrimonio exclusivo de su Facultad, sino que podrían extenderse a

casi todas, refiriéndose implícitamente a las norteamericanas. Su experimento no es reproducible, ni en estas últimas ni en otras, y algunas de sus conclusiones podrían cuestionarse, pero no cabe duda que promueve reflexiones válidas para cualquier escuela médica. La repetición imaginaria del experimento pondría en evidencia, dondequiera se realizase, algunos aspectos dignos de meditación. En casi todo el mundo, el número de postulantes para estudiar medicina rebasa la capacidad de las escuelas y al número de médicos requeridos por la sociedad, obligando a reducir en forma drástica la proporción de admisiones. Limitados los ingresos a la capacidad de cada Escuela, ésta debe asumir la responsabilidad de mejorar la enseñanza en todos los aspectos en cuanto al número y calidad de los docentes, la coordinación de los programas, un ajustado equilibrio entre la enseñanza científica y la práctica, enseñanza directa y personalizada, exámenes inteligentemente conducidos que permitan la valoración justa de cada candidato, especialmente en los primeros años, en cuanto a la capacidad para desempeñarse como médicos. La limitación del número también compromete la obligación de aspirar a la mayor justicia en las calificaciones, dejando el mínimo espacio al azar.

Obligada la limitación, surge una segunda responsabilidad que concierne a la selección, sobre la cual el Dr. Eichna insiste al referirse a la interrelación entre la formación que brinda el colegio y la subsiguiente enseñanza universitaria. La aplicación de criterios selectivos rigurosos se enfrenta con el elevadísimo número de postulantes, creando problemas de difícil solución. En esta selección debieran considerarse tres puntos. El primero, la estimación de las condiciones de los candidatos durante los últimos años de la enseñanza secundaria, naturalmente después de ajustados los planes de ésta y la evaluación individual. Lo segundo debiera ser la calificación mediante exámenes que permitieran estimar no sólo los conocimientos de las ciencias biológicas, sino también la formación humanística. Por último, quienes superasen lo anterior, debieran ser reexaminados, esta vez en cuanto a su responsabilidad, estabilidad emocional, integridad moral y carácter necesarios para ejercer una profesión de tantas dificultades.

No deben soslayarse los riesgos a que se expuso el Dr. Eichna, en su experimento bastando con recordar lo que pasó al Dr. Andrei Efímich Raguin en "La sala Número 6" de Antón Chejov, pero por fortuna llegó airosamente al término de su Maratón, dejándonos meditando sobre sus tres prioridades: el enfermo, la fundamentación científica de la enseñanza, y el valor inmutable, para estudiantes y doctores, de la ética. Al final, cabría preguntarse si repetido el experimento, real o imaginariamente, en otras carreras universitarias, el resultado final no sería igualmente desalentador.

R. Q. PASQUALINI

— — — —

La ciencia es precisamente lo más democrático que hay. Está abierta a todos los que digan la verdad. Los trabajos y los descubrimientos más arduos de un sabio pasan a ser caudal de todo el mundo, sin que él obtenga casi nunca lucro o recompensa.

BERNARDO A. HOUSSAY (1887-1971)

¿Sufrió Darwin la enfermedad de Chagas?

Leímos con interés el ya viejo aunque inconcluso tema sobre la presunta enfermedad chagásica de Charles Darwin que aparentemente contrayera durante su viaje por nuestro país. Calificamos al principio el interrogante del editorial de *Medicina (Bs Aires)* 40: 726, 1980, como viejo, porque fue inicialmente propuesto por el Prof. Adler en 1959 y luego debatido extensamente por autores brasileños, ingleses y el mismo autor de la teoría. Ya en 1965 el tema parecía haberse agotado; la falta de elementos diagnósticos precisos durante la época en que se produjo la muerte de Darwin, 1882, no impedía como contrapartida la producción de excelentes descripciones clínicas. En el caso particular de Darwin no hubo autopsia y su muerte se produjo antes que la enfermedad de Chagas fuera enunciada por su descubridor en 1909.

No sólo Darwin hizo una buena descripción del *Triatoma infestans*, ya que Félix de Azara y otros viajeros ingleses menos ilustres pero igualmente buenos observadores, como W. Bond Head, S. Haigh, etc., describieron los hábitos hematofágicos de este insecto comúnmente denominado en ese entonces en el territorio bonaerense como "chinche gaucha". Algunas de esas descripciones ocasionales incluyen el entretenimiento nocturno de algunos viajeros que recalaban en las postas, el que consistía en dejarse picar por los triatomíneos y observar el lleno del estómago del insecto que se dilataba con la sangre que succionaba.

Darwin sufrió un ataque, según sus mismas palabras por "benchucas" en Luján de Cuyo, Mendoza, en 1835. Relata también que un oficial del barco en el que viajó, el H.M.S. Beagle, se dejó picar ex profeso para observar el fenómeno hematofágico ya mencionado. Con un celo memorable, el almirantazgo británico llevaba un minucioso registro de las enfermedades de su personal embarcado y prestaba particular atención a pequeñas o grandes lesiones de tipo inflamatorio en las extremidades de los tripulantes, las que al parecer se originaban durante el lavado de las cubiertas de los barcos. Buscaban asimismo identificar las enfermedades que presuntamente podían provenir de lugares remotos y ser de características poco comunes. Las denominaban a veces fiebres o afecciones tropicales. En el caso del Beagle durante su periplo sudamericano no se registró en su personal la presencia de afecciones que pudieran sugerir o bien un Chagas agudo o cualquier otra enfermedad no común.

La sintomatología de Darwin mencionada en el editorial, comenzó antes de su viaje a Sud América y se presentó también después de aquél, aunque durante este período fue intermitente, sin signos físicos, y durante algún período no le impidió trepar montañas durante sus estudios de geología, sin consecuencias posteriores.

Con respecto a la sintomatología de Darwin como expresión de una presunta cardiopatía chagásica crónica existen algunos hechos que conviene analizar: *a)* Aun asumiendo que la sintomatología de Darwin haya tenido una base neurótica con antecedentes previos y que luego las manifestaciones se hubieran magnificado por una insuficiencia cardíaca secundaria a una cardiopatía chagásica crónica, sabemos hoy que cuando la insuficiencia ventricular se manifiesta es muy escaso el tiempo de supervivencia del enfermo chagásico, contabilizándose en sólo pocos meses en general la sobrevida. La insuficiencia cardíaca es o bien una etapa terminal de la cardiopatía que se diferencia bien de otras formas de presentación clínica y cuya evolución, o bien es muy corta, por la muerte súbita, o muy prolongada por un lento deterioro; Darwin sobrevivió casi 50 años a su viaje y a las "benchucas" de Mendoza; *b)* Es infrecuente aunque no imposible la coexistencia de una típica cardiopatía isquémica, que con gran certeza padeció Darwin al final de su vida, y la cardiopatía chagásica. Es este un fenómeno de observación corriente aunque desconocido en sus mecanismos. Esta rareza de asociación no es exclusiva de la cardiopatía chagásica sino también de otras miocardiopatías primarias y secundarias; *c)* Es muy sugestivo que el sagaz victoriano Bence Jones, médico de cabecera de Darwin, no atribuyera a un origen cardíaco las proteiformes manifestaciones clínicas de aquél ni describiera signos físicos que hicieran suponerlo; *d)* Según el mismo hijo de Darwin, Francis, autor de una biografía, su padre había hecho referencia epistolar en su juventud a un dolor o molestia que sentía en la región del corazón, aunque luego afirmó que nunca padeció ningún trastorno de esta naturaleza, ni serio ni permanente, hasta poco antes de su muerte; *e*) el Prof. Adler de la Universidad de Hadassa, Jerusalem, autor de esta interesante teoría sobre la enfermedad chagásica de Charles Darwin fue refutado en 1965 por el Prof. Woodruff de Londres, quien publicó sus argumentos en el *Brit Med J* del 20 de marzo de 1965, fuente de la cual parece haberse extraído gran parte del material del editorial de *Medicina*. El Prof. Adler reescribe su defensa en la misma revista el 8 de mayo de 1965 y los argumentos que ofrece en favor de su teoría son especulativos y de probabilidad, afirmando que si alguien ha permanecido un tiempo en una zona endémica palúdica y luego se enferma al abandonarla, la malaria deberá contarse entre los elementos del diagnóstico diferencial. Es nuestra opinión que el diagnóstico diferencial fue minuciosamente efectuado por Woodruff y la cardiopatía chagásica de Darwin razonablemente descartada.

Creemos fundamental no sobreestimar ni subestimar exageradamente a la vinchuca, poseedora sin duda de una poco común adaptabilidad biológica en todas sus especies. Su singular lucidez le ha asegurado ser vencedora contra legiones de sanitaristas, funcionarios, campañas de rociados y folklore. De todo eso ha salido aparentemente fortalecida pero no pudo impedir al menos, si es que le cupo una intervención transportadora de tripanosomas sobre quien accidentalmente las ali-

mentó en Mendoza en 1833, el desarrollo y enunciación de "El origen de las especies". Esta publicación le valió a Darwin después, penurias mayores en Inglaterra que las que eventualmente pudieron producirle las vinchucas. A favor de la inocencia de estas últimas, figura el importante hecho que Samuel Wilberforce, principal opositor de Darwin, no las conocía y no pudo por lo tanto inspirarse en ellas para agredirlo, su campaña opositora fue seguramente más deletérea para la salud de Darwin que las "benchucas" de Mendoza.

H. E. Castagnino
A. C. Thompson

° ° °

El editorial del Dr. Rodolfo Martín, publicado en *Medicina (Bs Aires)* 40: 726, 1980, sugiere, con prudencia, que Darwin jamás padeció de una enfermedad de Chagas. Los argumentos que aporta son valiosos y destacaré el que señala que sus síntomas comenzaron antes de conocer la "benchuca". Si el *post hoc ergo propter hoc* constituye una conocida falla de razonamiento, ¿qué diríamos del *pre hoc ergo propter hoc?* Ese argumento es más que sugestivo de que la supuesta enfermedad de Chagas de Darwin es un mito. Podría decirse que lo mismo ocurre con muchísimos de los 2 millones de chagásicos "putativos" que existirían en la Argentina y que sólo serían un producto de los prejuicios o de la imaginación de los que a falta de estadísticas serias se permiten afirmar cualquier cosa.

Por alguna razón, que no es el caso de analizar aquí, existe una tendencia a creer o sostener que hay muchos más enfermos de Chagas, sobre todo de miocardiopatía chagásica crónica, de los que en realidad existen en la Argentina. La cifra, repetida por diversos medios de difusión hasta el cansancio, señala que los chagásicos argentinos son más de dos millones. Dicha cifra, a pesar de haber surgido de fuentes oficiales, o tal vez, por haber surgido de fuentes oficiales, allá por el año 1973, carece de fundamento serio y no resiste el menor análisis. Sin embargo, es aceptada por muchas personas, incluso médicos, que probablemente reaccionarían con escepticismo si les dijésemos que en el país hay más de dos millones de diabéticos o de cirróticos o de insuficientes renales o cardíacos, a pesar de ser patologías que se ven a diario en cualquier hospital, cosa que no ocurre con la enfermedad de Chagas que para muchos es casi una enfermedad *vedette.* Que no se nos diga que eso se debe a que Buenos Aires no es un área endémica porque la proporción de pacientes, oriundos de zonas endémicas, que se atiende en los centros asistenciales de la capital y del Gran Buenos Aires, o para el caso en Mar del Plata, es elevada.

Pero volviendo a Darwin, lo que falta en el interesante editorial del Dr. Martín es un diagnóstico de la dolencia que afectó al eminente sabio. ¿A qué se debieron los síntomas atribuidos por algunos a "nuestro flagelo"? En mi calidad de patólogo me voy a permitir apoyar una hipótesis diagnóstica sobre la naturaleza del mal que afectó a Don Carlos durante tantos años. Basándome en los relatos del propio Darwin, de su familia y de otros contemporáneos, incluidos sus propios médicos, relatos que nos transcribe el Dr. Martín, diré que el ilustre enfermo padeció, como muchos otros hombres de genio, de lo que no hace tantos años, se conocía como neurastenia. Hoy por hoy se lo calificaría, con el mayor respecto, de neurótico con somatizaciones y síntomas depresivos. La vinculación entre tales síntomas y el conocimiento de la "benchuca" habría sido completamente fortuita y, por lo tanto, adhiero con entusiasmo al "desagravio" del Dr. Martín a su Mendoza natal.

R. A. Paz
Hospital Privado de Comunidad
Mar del Plata

° ° °

Los interesantes comentarios de los Dres. Castagnino, Thompson y Paz al editorial de MEDICINA, demuestran que el tema de la enfermedad de Darwin —si bien viejo— no está agotado y es susceptible de nuevas consideraciones. Con este ánimo se señaló en el editorial que existió un período muy breve entre marzo de 1835 en Mendoza y el año 1838 en Londres para afirmar que la enfermedad de Chagas estaba haciendo sus primeras manifestaciones. Este hecho no fue tenido en cuenta por Adler en su artículo condenatorio [1] ni por Woodruff [2] en la defensa posterior, y debe considerarse a la luz de datos obtenidos sobre la historia natural de la enfermedad. Es conocida la opinión de algunos autores [3] que el intervalo medio entre un episodio documentado de Chagas agudo (que Darwin no padeció) y la aparición de algunos signos asintomáticos de cardiopatía crónica es de 10 años en humanos. Si bien Woodruff declara "no culpable" al *Trypanosoma cruzi* en un trabajo extenso y en parte originalmente documentado, gran número de las evidencias patológicas que él presenta sobre la vida de Darwin fueron recopiladas anteriormente por otros autores [4-6] y pueden consultarse libremente.

1. Adler S: Darwin's Illness. *Nature* 184: 1102, 1959.
2. Woodruff AW: Darwin's Health in Relation to His Voyage to South America. *Br Med J* 1: 745, 1965.
3. Laranja FS, Dias E, Nobrega G, Miranda A: Chagas'Disease. A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. *Circulation* 14: 1035, 1956.
4. Hubble D: Charles Darwin and Psychotherapy. *Lancet* 1: 129, 1943.
5. Alvarez WC: The Asthenia of Charles Darwin. *In:* Nervousness, Indigestion and Pain, Hoeber, New York, 1947.
6. Scott Stevenson R: The delicate Health of Charles Darwin. *In:* Famous Illnesses in History, Eyre and Spottiswoode, London, 1962.

R. Martin

Efecto del Levamisol sobre la conversión tuberculínica en niños desnutridos

Se ha señalado al bacilo tuberculoso como uno de los que más frecuentemente infectan al desnutrido. Se ha comprobado también que los desnutridos calóricoproteicos (DCP) severos no reaccionan a la tuberculina, candidina, etc. Es por ello que la aplicación de BCG induce distintos grados de reacción cutánea a la tuberculina antigua (TA), de acuerdo al estado nutricional. El déficit de la inmunidad mediada por células ha determinado la búsqueda de factores biológicos o químicos para restablecer el estado inmunológico. El advenimiento de tales agentes nos ha motivado a evaluar un aspecto de la actividad farmacológica de uno de ellos.

Se estudiaron 39 niños de ambos sexos, de 2 meses a 3 años de edad; 33 presentaron reacción de Mantoux (RMx) negativa, de los cuales 15 eran eutróficos y 17 desnutridos de 1º y 2º grado; 7 eutróficos RMx positivos sirvieron como control. Todos habían recibido al nacer una dosis de 100 mg de BCG Doerr liofilizada por vía intradérmica y mostraban cicatriz de lesión vacunal. Durante todo el tiempo que demandó el estudio no se detectó en los casos contacto con tuberculosis. A los 32 niños RMx negativos se les administró por vía oral una solución de clorhidrato 1-2-3-5-6-tetrahidrato-6-fenilimidazo(2-1-b)tiazol (Levamisol), que contiene 5 mg de droga activa por ml, en dosis de 120 mg/m²/día; dos días consecutivos por semana, durante todo el tiempo de estudio. La observación clínica y las pruebas de laboratorio se practicaron al comienzo y cada 30 días, durante 4 meses.

Se realizó RMx inyectando intradérmicamente 0.1 ml de tuberculina bruta Biochem diluida 1:1000 en solución isotónica y se consideró positiva la aparición a las 48 horas de una pápula mayor de 5 mm de diámetro. Se efectuaron recuentos de leucocitos en cámara y de linfocitos por tinción de frotis; test de rosetas espontáneas según Wybran; test de transformación blástica celular (TTBC) con fitohemaglutinina (PHA) durante 72 horas, BCG Doerr liofilizada y tuberculina bruta diluida 1:1000 en solución isotónica durante 144 horas.

La conversión tuberculínica aconteció en el 60 % de los eutróficos y en el 58 % de los desnutridos. Entre el 2º y el 4º mes de tratamiento 64 % de los DCP habían alcanzado el trofismo normal, el 18 % experimentó una franca recuperación y el resto mantenía el mismo estado nutricional. Mientras que los valores absolutos de linfocitos T (LT) tanto en los eutróficos como en los desnutridos no mostraron diferencias, sus cifras relativas (% CFRE) estaban significativamente elevadas luego del tratamiento (Tabla 1). La normalización del TTBC con BCG y TA tanto en los desnutridos como en los eutróficos que mostraron conversión tuberculínica fue concomitante o previa a la positivización de la reacción cutánea. La anergia

TABLA 1. — *Linfocitos T en los niños tratados*

Linfocitos T		Desnutridos calóricoproteicos (DCP)				Eutróficos				
		Convertidos n = 10		No convertidos n = 7		Convertidos n = 9		No convertidos n = 6		Controles n = 7
		Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después	
Absolutos (LT)	$\bar{X}$	991.6	1605.2	1298.85	1903	1042.11	1628	1532	2013	1539
	DS	658	706	342	749	791.69	512	910	643	849
Relativos (% CFRE)	$\bar{X}$	19.4	29.8	20	29	17.77	31.9	23	36.5	31
	DS	8.6	9.11	4	5	5.02	10.7	8	6	11.3

Diferencias significativas de % CFRE ($p < 0.01$: Eutróficos convertidos, antes del tratamiento vs controles; DCP convertidos, antes del tratamiento vs después; DCP no convertidos, antes del tratamiento vs después; Eutróficos convertidos antes del tratamiento vs después; Eutróficos no convertidos antes del tratamiento vs después.

cutánea tuberculínica no ha sido para nosotros un parámetro fehaciente de la inmunidad deprimida, puesto que se ha manifestado también en niños normales y eutróficos con probada sensibilización del LT. Esta falta de reactividad podría ser consecuencia de la concentración antigénica en la prueba cutánea, ya que en el TTBC tal hipoergia no existía. La significativa disminución del porcentaje de CFRE y de la funcionalidad de los LT en los DCP nos indicaría un riesgo de infecciones en general, mientras dure la DCP y de infección tuberculosa mientras persista su anergia tuberculínica. Se comprobó que un alto porcentaje de los niños eutróficos hicieron su viraje tuberculínico entre los 30 y 90 días de tratamiento, en cambio los desnutridos lo efectuaron alrededor de los 120 días, esto podría deberse quizá a que eran niños cuya reactividad cutánea estaba deprimida. El tiempo requerido para la conversión tuberculínica fue menor al comunicado por otros autores. La anticipada respuesta in vitro del linfocito puede ser explicada por el efecto adyuvante del fármaco; esto se confirmó en la mejor capacidad blastogénica de los linfocitos de los niños tratados que aún no habían positivizado RMx. La adición de un antígeno específico a los cultivos también provocó transformación blástica pero con porcentaje inferior al logrado con PHA. O sea que las células T poseían receptores de membrana específicos para cada antígeno. En algunos casos la capacidad blastogénica para TA fue menos evidente que para BCG. En otros, el porcentaje de linfocitos estimulados con TA, igualó y aún superó el logrado con PHA. En general, previamente a la positivización de la reacción cutánea se observó un incremento de los parámetros de la IMC determinados in vitro, cuyos valores se mantuvieron un período muy breve y luego se aproximaron a las cifras normales. En los niños eutróficos se vio que la droga era capaz de restaurar los parámetros de la inmunidad celular. En todos los casos tratados hubo una recuperación del déficit pondoestatural, previo a la conversión cutánea. La mejoría nutricional se interpreta como consecuencia de la disminución de la frecuencia e intensidad de las infecciones. Convendría dilucidar si la normalización de los valores en los DCP luego del tratamiento fue solamente consecuencia de la droga o de ésta y el buen trofismo alcanzado. El aumento de la resistencia a las infecciones se evidenció por disminución o desaparición de infectopatías que frecuentemente afectaban a estos niños. No se registraron reacciones indeseables o efectos secundarios. Solamente hubo un caso en el que hubo una disminución de susceptibilidad a las infecciones pero reaparecieron signos respiratorios mayores de hipersensibilidad de tipo inmediato, precedidos de un cuadro purpúrico y lesiones atópicas de piel que desaparecieron fugazmente. Estos hallazgos, que sin duda necesitan ser ratificados utilizando mayores concentraciones de antígeno para las cutirreacciones y técnicas in vitro más sensibles, podrían ser aplicados en el ámbito médico-diagnóstico considerando la anticipada positividad del TTBC sobre la RMx.

L. M. Vanella, A. M. González Lascano, V. M. Miguez

Instituto para Estudios Inmunológicos, Universidad Nacional de Río Cuarto

— — — —

FE DE ERRATA

En el Nº 1 del Volumen 41 de *Medicina (Bs Aires).*

1) Página 94, anteúltima línea, dice: Pablo Neruda (1867-1916); debe decir: Pablo Neruda (1907-1973).

2) Página 110, Tabla 3, última línea de la 2ª columna, dice: *alto;* debe decir: *atto.*

COMENTARIOS BIBLIOGRAFICOS

Viruses in naturally occurring cancers. Myron Essex, George Todaro, Harald zur Hausen (eds), Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, Volume 7, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980, 1284 pp.

Las primeras observaciones sobre la virología oncológica se hicieron en animales de laboratorio en circunstancias artificiales. En los últimos años, debido principalmente al desarrollo de técnicas de biología molecular, se ha podido asociar a los virus oncogénicos, tumores espontáneos a lo largo de la escala zoológica. Se ha podido demostrar, además, que por transmisión horizontal ciertos retrovirus y virus herpes son capaces de inducir tumores en condiciones naturales en especies tan diversas como aves, gatos, bovinos y gibones. En cuanto a los tumores humanos, la situación permanece muy compleja; por un lado, las evidencias directas de participación viral son pocas, y por el otro, para la mayoría de los cánceres, la etiología, viral o no, sigue siendo un misterio. Estudios epidemiológicos apoyan una asociación entre el virus herpes Epstein-Barr y el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo; recientemente se ha encontrado también una asociación entre el virus B de la hepatitis y el carcinoma hepatocelular, con apoyo experimental en el modelo animal recientemente descripto en la marmota. Los dos volúmenes que comprenden los 94 trabajos presentados en la 7ª conferencia sobre proliferación celular en *Cold Spring Harbor* por más de 200 especialistas en el tema, forman una obra de gran valor para oncólogos y virólogos. Se trata de una importante puesta al día sobre, entre otros: los virus herpes humanos; virus papiloma, polioma y SV 40; virus de la hepatitis B; retrovirus aviarios y murinos; retrovirus felinos y de primates; retrovirus bovinos y ovinos, y virus causantes de tumores mamarios. La última sección está dedicada a los factores de regulación en la interrelación virus-cáncer, incluyendo experimentos en pleno desarrollo sobre, por ejemplo, la estimulación crónica de linfocitos T y el desarrollo de linfomas, la ateroesclerosis inducida por virus herpes, transcriptasa inversa y embriogénesis, etc. Vale la pena hacer resaltar la importancia que tiene el resumen final que abarca las últimas 15 páginas, en el cual George Todaro ubica el problema de la etiología viral del cáncer en el contexto de lo que se sabe en la actualidad, discutiendo con autoridad e ideas personales lo relativo a cada familia de virus involucrada.

Viral oncogenes. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Volume 44, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980, 1322 pp.

Se trata de una monumental obra en dos tomos que reúne los 141 trabajos presentados en *Cold Spring Harbor Laboratory* durante el simposio sobre oncogenes virales en 1979, con la participación de 262 autores y la asistencia de más de 4000 investigadores. El director de ese centro, James D. Watson, recalca en el prefacio que el estudio de los virus oncogénicos recibió su primer impulso con el establecimiento de los cultivos de células en la década del 60, seguido de un segundo estímulo con el descubrimiento de la transcriptasa inversa en la década del 70, lo que hizo que en 1974 tuviera lugar el primer simposio de ese laboratorio sobre virus tumorales; en los últimos 5 años los progresos han sido aún más agigantados en base al descubrimiento de las enzimas de restricción y al desarrollo de la metodología aplicada a la biología molecular, lo que hace que esta obra llegue a aportar una impresionante cantidad de datos, la mayoría de los cuales se encuentran en plena etapa de desarrollo. El conjunto de trabajos va dirigido a los muy especializados en el tema a pesar de que, como es habitual en la cuidada preparación de los libros de este laboratorio, los trabajos de sinopsis, introducción y resumen son de gran valor para los virólogos u oncólogos menos especializados; en este caso, están escritos por L. V. Crawford, P. H. Duesberg, H. M. Temin y P. A. Sharp, respectivamente. Las diferentes secciones incluyen, entre otras: RNAs y proteínas tempranas en los virus DNA; antígenos T; genes de transformación de los adenovirus; la célula transformada; el genoma y proteínas de los retrovirus; el gen src; provirus y su expresión; el fenotipo de transformación y diferenciación; virus de la leucemia tímica, etc. Este volumen, Nº 44 de esta importante serie, no debería faltar en las bibliotecas de centros que se dedican a virología y/o oncología.

Kidney Transplantation. Principles and Practice. Peter J. Morris (ed). Academic Press, London, 1979, 408 pp.

Este libro ha sido editado por el Prof. Morris, jefe de la Unidad de Transplante Renal de Oxford, y han colaborado 23 autores (12 británicos 6 estadounidenses y el resto de Dinamarca, Canadá y Australia). La obra comienza con un prefacio "triunfal", en donde se relata la historia del transplante renal y se transcribe un párrafo del Prof. Medawar que cuenta cómo su interés en la biología del transplante nació al ser consultado (¡como biólogo experimental!) por un enfermo que había perdido el 60 % de su piel como consecuencia de una bomba arrojada en los primeros años de la segunda guerra mundial. Luego siguen 20 capítulos, entre los cuales figuran los clásicos en el tema (inmunología, HLA, técnicas quirúrgicas, etc.) y otros que resumen conocimientos más recientes (monitoreo inmunológico antes y después del transplante, inmunosupresión específica, complicaciones cardiovasculares y transplante y cáncer). Ambos tipos de capítulos enfatizan —como el título del libro ha querido señalarlo—, los principios y la práctica de esta subespecialidad de la "nefroinmunología". Es así que algunos capítulos contienen una amena introducción histórica y la mayoría una formulación fundamentada y crítica de los problemas a tratar. Luego se señala lo que es práctica corriente, se tratan en forma muy resumida avances modestos recientes (por ejemplo, la influencia beneficiosa de las transfusiones sanguíneas, el uso de la ciclosporina A) y solamente un capítulo al final, de 3 páginas, hace referencia a futuras innovaciones clínicas en base a diseños experimentales en inmunología básica. En los resultados del transplante con dador cadavérico se enfatiza que la sobrevida de los transplantes no ha mejorado sensiblemente desde 1968, a pesar de que la sobrevida de los pacientes (por el uso combinado de diálisis y transplante) sí ha mostrado una sensible mejoría. Este libro resultará sumamente interesante para los que comienzan con el tema (Médicos Residentes e Internistas) y para los que estando en la subespecialidad quieran "poner en perspectiva" conocimientos adquiridos previamente y reflexionar sobre sus tareas clínicas a través de una lectura rápida.

Advice to a Young Scientist. Peter B. Medawar. Harper Row, New York, 1979, 109 pp.

En este libro dedicado a la Royal Society de Londres, Medawar continúa con su prolífica producción de libros vinculados a la ciencia. Este, aunque menos proclive que algunos anteriores a disquisiciones filosóficas, constituye un excelente conjunto de consejos a quienes pretenden convertirse en investigadores biomédicos, y también a aquellos investigadores que, aunque maduros y sazonados, no les viene de más reflexionar sobre muchos aspectos de su *métier*.

En el prefacio, Medawar reconoce que al dar consejos a la juventud se encuentra en buena compañía. Polonius en *Hamlet*, Lord Chesterfield y William Cobett, y el comentarista añadiría, por qué no, nuestro viejo Vizcacha. Que éste no sea un dechado de virtudes tampoco tiene importancia, pues según Samuel Johnson, los consejos de Lord Chesterfield se referían a la educación externa del joven que debía comportarse como un maestro de danzas, pero desde el punto de vista moral no eran mejores que los que puede dar una prostituta. La Rochefoucauld podría integrar el grupo ya que en una de sus *Máximes* señala que los viejos dan buenos consejos porque no pueden ya dar malos ejemplos.

En la introducción, Medawar señala que en el mundo debe haber entre 750 000 a 1 000 000 "cientistas", de los cuales alrededor de 300 000, o algo más, son estadounidenses. Observa, también, la ambigüedad del término, puesto que gente que desarrolla una actividad rutinaria, pero que utiliza también instrumentos que emplean los científicos, puede considerarse a sí mismo un científico. Tal vez, para no dejar dudas, debería emplearse la palabra investigador y no hombre de ciencia o "cientista". Puede haber científicos cuyas tareas de rutina sean muy importantes, como el control de potabilidad del agua corriente, etc. Lo que es seguro es que si no hacen otra cosa o no diseñan nuevos y mejores aparatos, no son investigadores. Para Medawar, es un error hablar de hombre de ciencia como si fuera un denominador común, pero esto toca más al tema de los universales y particulares y no vale la pena entrar en una discusión superficial. El capítula 2 trata de las condiciones que debe tener un investigador; no es necesaria una gran inteligencia sino una gran perseverancia y ser capaz de sentir esa elación del descubrimiento, lo que Freud denomina "el sentimiento oceánico". Medawar refiere un experimento que él mismo ha realizado con audiencias académicas para demostrar lo poco acostumbrados que están a pensar por su cuenta: trae a colación las famosas figuras del Greco estilizadas o alargadas, cuya explicación reside, según un oftalmólogo, en que el Greco tenía visión defectuosa. Medawar señala que quien no advierte que esto no tiene sentido y que es una falacia, es porque tampoco sabe pensar por su cuenta. Pero se puede aprender a pensar, lo mismo que sucede respecto a las habilidades manuales y la destreza en el manejo de instrumentos. Sin embargo, si el aprendiz de investigador siente que el hacer cosas con las manos es una actividad inferior, mejor es que abandone el intento de ser un investigador. En el capítulo 3, el autor señala que investigar algo importante es la única forma de descubrir al-

go importante. No siempre se cumple este propósito pues la "serendipitia" cuenta como un importante factor en algunos descubrimientos. Una pregunta que hace todo principiante es el motivo del capítulo 4. ¿Cómo prepararse para convertirse en un investigador o para ser mejor investigador? El consejo de Medawar es muy atinado. Hay que leer mucho pero no pasarse meses en la biblioteca pues esto es una forma de "escapismo" al huir de la investigación encontrando un substituto meritorio. Si se quiere investigar, pues que investigue nomás aunque al principio los resultados no sean más que repeticiones de otros. El capítulo 5 trata de la influencia del sexo y de la raza en la investigación. Para Medawar la intuición femenina no tiene nada que ver con la investigación; es un sexto sentido para las relaciones humanas con el otro sexo. Las mujeres, si son inteligentes, perseverantes y tienen energías, llegan a donde llegan los hombres con las mismas características. El comentarista cree que no es así por razones biológicas, pues en la especie humana quien cuida principalmente de la crianza y educación de los hijos es la mujer. Felizmente, no tenemos los hombres el deber ni las ganas de imitar a los ñandúes machos que son los que empollan los huevos y esto de educar a los hijos lleva tiempo, años y preocupaciones sin cuento. Medawar también toca el tema de los *teams* de investigadores formados por ambos esposos. Asunto difícil y delicado y que mejor sería evitarlo. Habría que preguntarle a Mr. Thatcher si esto resulta fácil. Respecto a las razas y nacionalidades señala que un *team* para la "Copa del Mundo" que estuviera compuesto por los miembros de una pequeña nación, como Austria, disipa todo exclusivismo científico. Los nombres que cita Medawar son Herman Bondi, Sigmund Freud, Karl von Frisch, Ernst Gombrich, F. A. von Hayek, Konrad Lorentz, Lisa Meitner, Gustav Nossal, Max Perütz, Karl Popper, Erwin Schrodinger y Ludwig Wittgenstein.

El capítulo 6, el más extenso de todos, atañe a temas comunes que todos los investigadores conocen: el problema de la prioridad, de las obligaciones morales del científico, ciencia y religión, la colaboración entre los científicos de un *team* o grupo de trabajo, las relaciones con los técnicos (Medawar las sintetiza al considerar a los técnicos como colegas), la diferencia entre ciencia pura y aplicada. La superioridad y el snobismo de considerar a la primera superior a la segunda era trasunto del concepto del caballero o del gentleman, que no debía realizar trabajos manuales y que regía en el siglo XVIII y parte del XIX. Por el contrario, en los movimientos populares que invadieron nuestras universidades en los aciagos años recientes, la ciencia pura era tarea de lujo para élites que se desentendían de las realidades sociales, concepción que es producto de la ignorancia y de la petulancia que ésta origina, pues sin ciencia pura al poco tiempo tampoco hay ciencia aplicada. Ambas son igualmente necesarias, pero la última depende de la existencia de la primera.

En el capítulo 7 se discute el tema, no el problema, de los científicos jóvenes y de los viejos. Un éxito demasiado resonante puede ser perjudicial para el joven científico si no tiene un buen desarrollo filosófico, pero también pueden ser "Hubris" los viejos. Medawar trae el ejemplo de un comité que le negó fondos a Florey porque el futuro de las drogas antibacterianas residía en los productos sintéticos orgánicos. Tal vez este ejemplo puede demostrar la imposibilidad de la futurología en la investigación cuando no se trata de perfeccionar algo ya descubierto, sino de opinar sobre algo que se desconoce, Oscar C. Croxatto solía decir que la suma de ignorancias no produce conocimientos. El capítulo siguiente ofrece consejos razonables y lógicos de cómo presentar un trabajo y cómo escribirlo. El capítulo 9 se ocupa de los distintos tipos de investigación que aparecen en la historia de la ciencia: 1º El experimento según Bacon: la verdad está a nuestro alrededor. Basta mirarla con los ojos sin prejuicios y sin pecado para descubrirla. Pero Bacon señala que la buena suerte no es siempre suficiente para descubrir algo, se necesita diseñar experimentos y el filósofo natural debe convertirse en el arquitecto que expande la realidad para penetrarla. Así se coleccionan hechos que por inducción nos permiten entender al mundo natural; 2º El experimento aristotélico. En él se planea el experimento para demostrar la verdad de una idea preconcebida, método que, como Medawar señala, era despreciado por los miembros de la *Royal Society*; 3º El experimento según Galileo. En él las hipótesis se ponen a prueba planeando experimentos que demuestran su verificabilidad o falsedad, mucho más esta última que la primera. Es imposible demostrar que algo es verdadero, pero sí demostrar que algo no concuerda con la hipótesis; 4º Experimentos según Kant: Parecería que el conocimiento independiente de la experiencia no tendría cabida en la ciencia. Medawar recalca que la fisiología de los sentidos se mueve en una dirección kantiana y lo mismo apuntan las geometrías no euclidianas. El comentarista se siente dispuesto a añadir un párrafo de la "Filosofía científica" de Reichenbach, ya que se ha tocado un tema epistemológico. Además, a los médicos les gustan las comparaciones concretas y la cita de Reichenbach se refiere a Bacon: "Los empiristas son como las hormigas que recogen el material y luego lo depositan sin orden alguno. Los racionalistas son las arañas que tejen sus telas sacándolas de sí mismas. Los empiristas modernos son las abejas que recogen el material de la naturaleza pero lo transforman y le añaden algo de su propia substancia, cuyo resultado es la miel".

El libro de Medawar merece que lo lean los investigadores jóvenes. Sin embargo, el comentarista teme que lo leerán sólo los viejos investigadores que ya conocen y aplican la mayor parte de sus consejos, aun a veces, como monsieur Jourdain, sin darse cuenta de ello.

Blood, pure and eloquent: A story of discovery, of people, and of ideas. **Maxwell M. Wintrobe, Mc Graw-Hill, New York, 1980, 771 pp.**

La historia de la hematología relatada en esta obra se lee casi como si fuera una novela de ciencia ficción. La lujosa presentación, con numerosos retratos y reproducciones de cuadros afines al tema, y con la participación de autores que fueron pioneros o aportaron contribuciones importantes en los temas a su cargo, hacen que no sólo el hematólogo, sino también el médico y aún el no-profesional interesado, se deleiten al recorrer sus páginas. Wintrobe, bien conocido por su texto de hematología, se destaca como historiador en el capítulo inicial que titula "Pilares en el camino del progreso" al tiempo que impone su estilo fluido y ameno a los autores de los capítulos que siguen. En ellos, Hart describe los aportes de la paleohematología incluyendo el estudio de las momias que hace al origen de algunas hemopatías; siguen capítulos sobre la médula ósea de Tavassoli, sobre células progenitoras de Lajtha, sobre el bazo de Crosby, sobre glóbulos rojos de Beutler, hierro y heme de London, hemólisis de Dacie, eritropoietina de Erslev, anemia perniciosa de Castle, talasemia de Weatherhall, fagocitosis y granulocitos de Craddock, linfocitos de Ford, leucemia y linfoma de Gunz, plaquetas de Spaet, proteínas plasmáticas de Janeway, hemostasis de Ratnoff, y grupos sanguíneos y transfusión de Diamond. Unas páginas finales con una exposición sintética de lo que es la hematología acompañada de un extenso glosario, facilita la lectura a los no-especialistas. La bibliografía de cada capítulo ha sido cuidadosamente seleccionada. Los dos descubrimientos que le corresponden a la Argentina están citados: la primera transfusión de sangre citratada por Luis Agote, trabajo publicado en los *Anales del Instituto Modelo* en 1915, y el descubrimiento de la segunda variedad de hemofilia, más tarde adjudicada a la falta de Factor IX, por Alfredo Pavlovsky en 1944. En este último caso hubiera sido preferible que figurara la cita original que corresponde a un trabajo en *Medicina (Bs Aires)* 5: 16, 1944, y no la de uno posterior publicado en *Blood* en 1947. A lo largo de las páginas uno encuentra cómo surgieron los principales descubrimientos, por ejemplo, la terapia de la anemia perniciosa con hígado en 1925 en el laboratorio de Minot y Murphy, lo que llevó al hallazgo del factor intrínseco por Castle en 1929, cómo Wintrobe introdujo la determinación del hematocrito en 1929, etc. Sin embargo, los descubrimientos más trascendentes se hicieron en los últimos 30 años, tal vez el más llamativo, la transformación del linfocito desde una célula terminal e insignificante en todo un sistema linfocitario, base de la función inmunológica. Así fue que en los últimos años surgieron sub-especialidades conocidas como inmunohematología, oncohematología, hemostasis, trombosis, etc. En cuanto a los que hacen investigación biomédica, se deleitarán con el último capítulo escrito también por Wintrobe, sobre las lecciones que nos enseña la historia: en él, resaltan no sólo sus dotes académicas, sino también su gran comprensión de lo que es la investigación, todo lo cual está dicho con palabras que tienen una resonancia semejante a la poesía de donde se inspiró para el título de la obra:

...her pure and eloquent blood,
Spoke in her cheekes, and so distincktly wrought,
That one might almost say, her bodie thought.

...su sangre, pura y elocuente,
Hablaba en sus mejillas, y se expresaba tan
[claramente,
Que casi se podía decir, que su cuerpo pensaba.

JOHN DONNE (1572-1631)

El glóbulo rojo y sus alteraciones. **Alberto Daiber E., Editorial Andrés Bello, Santiago de Chile, 1980, 368 pp.**

Según el prefacio del autor, "este libro nació del deseo alimentado por años de entregar a estudiantes e internos un texto actualizado, sencillo y ameno, de lo que es el glóbulo rojo y sus alteraciones". El propósito se cumplió ampliamente, después de salvar muchas dificultades inherentes a la publicación de este tipo de texto en un medio no habituado a ello. El libro consta de 21 capítulos, en 12 de los cuales colaboran otros hematólogos chilenos. Se incluyen tanto los conocimientos básicos de la médula ósea, la genética humana, la respuesta inmune y el metabolismo del hierro, como las descripciones de las enzimopatías y de las anemias de distintas etiologías. Se destacan los capítulos sobre aplasia medular y hemoglobinuria paroxística nocturna (especialidad del autor), y el que trata del trasplante de médula ósea en anemia aplástica escrito por el Dr. Sorensen desde un centro de Cleveland especializado en el tratamiento de estos enfermos. Contiene, además, un pliego de 16 páginas de láminas en color con preparaciones de sangre periférica y médula ósea de diversas afecciones, además de fotografías ilustrativas de los distintos síndromes anémicos. Esta obra merece estar en todos los centros de hematología de habla española, no sólo como homenaje a un esfuerzo inusual sino porque su nivel alcanza el de las mejores obras de difusión internacional en este tema.

Vida de médicos ilustres. Raúl F. Vaccarezza. Troquel, Buenos Aires, 1980, 167 pp.

En ocasión de comentar el libro anterior de R. F. Vaccarezza, ***Historia de una idea: Contagiosidad de la Tuberculosis***", decíamos que no era la importancia de la obra el principal estímulo para el comentario, sino la importancia del autor. Y ahora reiteramos el concepto, porque las biografías son válidas en la medida que es valedero el espíritu crítico de quien las escribe. Y tanto es así, que el mismo Vaccarezza en el prefacio admite que "cierta crítica literaria tiende a restar valor a los estudios biográficos". Los traductores y los biógrafos han de poseer formación técnica y ética de nivel cercano al de los inspiradores de sus obras para ser aceptados como veraces por los lectores.

La obra está integrada con los retratos de ocho médicos: dos son extranjeros, el sabio alemán Roberto Koch y el clínico francés Emile Sergent, los seis restantes son argentinos dispuestos por orden cronológico: Francisco Javier Muñiz, Juan José Montes de Oca, Enrique Tornú, Luis Agote, Gregorio Aráoz Alfaro y Alejandro A. Raimondi. Entre el nacimiento del primero, 1795, y la muerte del último en 1945, transcurre como es obvio casi toda la historia de la Argentina como país independiente, de modo que al ubicar a cada personaje en el marco y contexto de su época, Vaccarezza, con el pretexto de multiplicar el homenaje a sus memorias, refresca las inteligencias de quienes deben seleccionar a los dirigentes, para recordarles que, cualquiera sea la época o el régimen político imperante, sólo los mejores producen progreso, sólo los mejores pueden ayudar a construir el país que todavía hay que hacer.

Con respecto a los lectores: si bien es cierto que las biografías de personajes argentinos no suelen convertirse en ***best sellers*** porque se ha abusado del género, pretendiendo recuperar del olvido a tantos personajes sin relevancias (como promueve el periodismo a tantos personajes actuales de la "farándula", del deporte o del exitismo, que nunca influirán en el curso de la historia), es cierto también que los jóvenes de hoy son muy sensibles al testimonio del sabio, del santo y del héroe, y es una buena acción de Vaccarezza rescatar del olvido a estos hombres de excepción.

Al terminar de leer el libro y olvidando los detalles, el lector queda con la impresión de que estos médicos ilustres tuvieron una cosa en común, su itinerario por la vida: egresaron de una facultad no apta para una formación adecuada, se trasladaron entonces a Europa a completar lo que les faltaba; al regresar al país pronto se incorporaron a la vida universitaria y al trabajo privado simultáneamente; pero luego de los 40 o 50 años dedicaron todos sus esfuerzos a las instituciones, sean estas universidades, hospitales, Departamento Nacional de Higiene o aún la legislatura. En 1980 ¿las instituciones nacionales no seleccionan a los mejores? ¿O los mejores ya no creen en el valor de las instituciones? Es de desear que Vaccarezza siga escribiendo para ayudar a encontrar la respuesta.

Endoscopy and Biopsy in Gastroenterology. Technique and Indications. P. Frühmorgen, M. Classen (eds). Springer-Verlag, Berlin, 1980, 198 pp.

Se trata de un completo y muy práctico manual con 2 secciones, 23 capítulos, con sus respectivas referencias, hasta totalizar 188 citas y 108 ilustraciones en sus 198 páginas. Figuran 15 colaboradores de la República Federal Alemana y como único extranjero G. Menghini, a quien corresponde el capítulo de la biopsia hepática a ciegas con la técnica y aguja de su diseño.

La primera sección abarca todo lo relacionado con la organización de un servicio de endoscopía, cuidados, esterilización y mantenimiento del instrumental, recopilación de hallazgos endoscópicos y conducta frente a las complicaciones con estos procedimientos, para terminar con la forma de obtener y procesar el material de biopsia y citológico. En la segunda sección separadamente se presentan los métodos endoscópicos digestivos actuales, con la descripción del instrumental correspondiente, preparación del paciente, indicaciones y contraindicaciones, técnica y posibles complicaciones.

Se analiza así con esquemas ilustrativos el examen del tracto digestivo alto incluyendo el intestino delgado; el estudio del estómago operado y de la emergencia que impone esto como primera medida. La endoscopía retrógrada de la vía biliopancreática también integra este breve tratado. En la parte que se ocupa de la colonoscopia se analizan claramente las dificultades técnicas, las maniobras para intentar sortearlas y las complicaciones en el manejo inapropiado del instrumento o durante la extirpación de pólipos. La endoscopía terapéutica está contemplada por los editores de la obra y describe las posibilidades de extraer cuerpos extraños, material de sutura, de realizar papilotomías, polipectomías, inyecciones esclerosantes de várices, aplicaciones con el Laser, etc. Se mencionan los beneficios de la endoscopía intraoperatoria del colédoco y del Wirsung.

La laparoscopía abarca varios capítulos donde con este útil procedimiento puede documentarse las imágenes fotográficamente y ser empleado también para el examen y biopsia del páncreas, esplenoportografía y colecistografía además de la investigación hepática habitual. Finalmente se presenta todo lo referente a la colangiografía percutánea transparietohepática, aguja de Chiba, etcétera.

En conclusión, es un excelente manual que se lee muy fácilmente y donde incluso obtendrá beneficios el endoscopista de experiencia que verá ampliadas sus posibilidades de estudio.

Acute Care. B. M. Tavares, R. Frey (eds). Springer-Verlag, Berlin, 1979, 345 pp.

Este libro se halla basado en los resúmenes del Simposio Internacional en Terapia Intensiva realizado en Río de Janeiro en noviembre de 1977. Como tal, no constituye un volumen descriptivo de todos los aspectos de la terapia intensiva, sino un conjunto de trabajos, ordenados en 10 capítulos: metabolismo en terapia intensiva, monitoreo del paciente crítico, organización de la terapia intensiva, hematología y coagulación, respiración, gastroenterología, cardiología, shock, infección, efectos colaterales e indeseables de las drogas.

La terapia intensiva, más que una especialidad propiamente dicha, constituye una modalidad operativa, dentro de la medicina interna y la cirugía; los problemas metodológicos, las dudas e interrogantes que aquejan a quienes cuidan la fisiología alterada en los pacientes muy enfermos, se ven reflejados en las inquietudes de los autores participantes. Es deseable, además, que quienes se acerquen a la laboriosa tarea de cuidar enfermos críticos, lean trabajos originales y los comparen con una experiencia cuidadosa y prolongada, en lugar de leer manuales o compendios y arriesgar tratamientos. En *Acute Care* se identificaron los problemas de la terapia intensiva, en particular y de la medicina en general, en el sentido de cómo otorgarle un valor adecuado a procedimientos diagnósticos y métodos terapéuticos; sin embargo, existe una desigualdad marcada entre la calidad de los trabajos y su validez conceptual. Así, Gómes y col. (pág. 9) cuestionan la utilización del exceso de base en el estudio del equilibrio ácido base en la hiperlactatemia en una experiencia que incluye determinaciones de lactato y piruvato y gases en sangre en 5 perros y en 5 pacientes con patología variada; en realidad, el exceso de base no es imprescindible (si se cuenta con bicarbonatemia, anión *gap* y concentración de H+) para clasificar o diagnosticar la acidosis metabólica, pero es un número operativo y práctico y de hecho aunque puede hallarse hiperlactatemia sin acidemia, la regla es lo opuesto. Delooz (pág. 14) ya prevé el valor de la diálisis peritoneal y el nitroprusiato de sodio en el tratamiento de la acidosis láctica severa. Michel y Bachy (pág. 35) adelantan las complicaciones del catéter en la vena subclavia, que se deben considerar como significativas (4 % no infecciosas y 13 % infecciosas), lo que limita su utilización; el comentarista no está de acuerdo con ellos en utilizarlo sólo para medir presión venosa central y cree muy restringidas las indicaciones de la alimentación parenteral (por esta o cualquier otra via). Raimondi y col. (pág. 185) exponen sus hallazgos en pacientes con bronconeumonía sometidos a asistencia respiratoria mecánica y presión positiva espiratoria continua; en ese momento encuentran pocos cambios significativos en los parámetros respiratorios y un cierto deterioro hemodinámico; hoy (inclusive los mismos autores) se recomienda el método para tratar el *distress* respiratorio del adulto, aunque seguimos sin saber si la mejoría en el Aa DO_2 o el $\dot{Q}s/\dot{Q}t$ dependen de reclutamiento alveolar o de la caída del índice cardíaco y mayor adecuación, ventilación y perfusión. Goulon y Margent refieren aspectos clínicos y del tratamiento del shock tóxico-infeccioso; los autores no aportan datos nuevos en este tópico y el consumo de O_2 calculado parece muy alto, porque para un índice cardíaco de 2179 l/min/m² le correspondería una diferencia arteriovenosa de 5.94 vols % que parece elevada para pacientes sépticos. Asimismo, se objetiva un descenso en la curva de función ventricular más allá de 10 mmHg de presión capilar que los autores no advierten. Rapin y col. (pág. 317) esclarecen los mecanismos de sobreinfección en terapia intensiva y McArthur (pág. 331) enfatiza el papel del género *Acinetobacter* en la sobreinfección en pacientes con asistencia respiratoria mecánica o nebulizadores y hemodializados. La evaluación cuidadosa de los trabajos permitirá al lector acercarse al mundo y a los problemas de la terapia intensiva.

Experimental leukemia and mammary cancer. Induction, prevention, cure. Charles B. Huggins. The University of Chicago Press, Chicago, 1979, 221 pp.

Charles B. Huggins recibió el Premio Nobel de Medicina en 1966 por sus trabajos en cáncer experimental y en especial sobre el tratamiento del carcinoma de próstata con estrógenos. Este libro es en cierto sentido una autobiografía de sus últimos 20 años en el laboratorio, de un total de 50 años. Su prefacio tanto como cada experimento que describe en detalle, reflejan el placer que siente en hacer investigación: "la ciencia no es fría e insensible; en la investigación científica uno se encuentra emocionalmente involucrado en el problema". El libro se compone de 10 capítulos que abarcan: la célula cancerosa; los virus oncogénicos; carcinogenesis por cuerpo extraño; hormonas y cáncer; carcinógenos químicos y cáncer de mama en ratas; aceleración y detención del cancer mamario de la rata; inducción de leucemia en la rata; prevención de la leucemia y del cáncer mamario inducidos por hidrocarburos; linfomas y tumores de ovario inducidos por hidrocarburos en el ratón. El libro termina con una reproducción de la conferencia del autor al recibir el Premio Nobel. La forma sencilla y a la vez detallada en que se relatan los distintos experimentos entusiasmará a todos los que hacen investigación en oncología y en endocrinología; encontrarán también reseñas históricas y bibliografía sobre los experimentos originales que no son fáciles de hallar en otras publicaciones.

AVISO A LOS SUSCRIPTORES

En el curso del año 1981 se publicarán 6 números bimensuales y un Suplemento sobre: XXV ANIVERSARIO DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLOGICAS.

Nos permitimos recordarle que el importe de la renovación de su suscripción a partir del 1º de Junio en:

MEDICINA

BUENOS AIRES

Volumen 41 de 1981

Suscripción Anual:	**$ 140.000**
Médicos Residentes:	**$ 90.000**
Becarios:	
Estudiantes:	
Cobrador a Domiciilo:	**$ 155.000 ó $ 100.000**
Exterior:	**u$s 35**

NOMBRE ....

DIRECCION ....

Cheques o giros a la orden de: FUNDACION REVISTA MEDICINA

MEDICINA

Instituto de Investigaciones Médicas
Donato Alvarez 3150
1427 Capital Federal

MEDICINA (BUENOS AIRES)
FUNDADA EN 1939

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

REVISTA BIMESTRAL
(Registro de la Propiedad Intelectual Nº 87.075)

Publicada con el apoyo del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

MEDICINA no tiene propósitos comerciales. El objeto de su creación ha sido propender al adelanto de la medicina argentina. Los beneficios que pudieran obtenerse serán aplicados exclusivamente a este fin

Aparece en Current Contents, Biological Abstracts, Index Medicus y Excerpta Médica

REGLAMENTO DE PUBLICACIONES

MEDICINA *publica trabajos de medicina clínica o experimental, entendiéndose este término en el más amplio sentido de la palabra. Los artículos a publicarse deberán ser originales e inéditos aunque serán también aceptados aquellos que hubieran sido comunicados en sociedades científicas o publicados en forma de «resúmenes». En caso de haber sido presentado a la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, corresponderá mencionarlo citando la fecha de la reunión.*

La redacción se reserva, además, el derecho de introducir —con el conocimiento de los autores— todos los cambios editoriales exigidos por las necesidades tipográficas, la compaginación, el reglamento de publicaciones o por razones económicas.

Casuísticas, Adelantos en Medicina, Artículos Especiales y *Cartas al Comité de Redacción* serán publicados en castellano. Los *Artículos Originales* podrán redactarse en castellano o en inglés indistintamente. Los manuscritos deberán ser escritos a máquina, a doble espacio, y enviados por duplicado.

Las *historias clínicas* serán expuestas sintéticamente. Protocolos, registros, etc., sólo se reproducirán si ilustran significativamente el texto.

Las *tablas*, presentadas en hojas individuales, deberán estar numeradas, ser indispensables y comprensibles por sí mismas, y poseer un título claramente explicativo de su contenido. Sólo se permitirá una superficie total de tablas equivalente a una página de la Revista: todo excedente estará a cargo del autor.

Las *figuras* comprendiendo ilustraciones de cualquier naturaleza (radiografías, fotografías, registros, etc.), se presentarán numeradas correlativamente. En su parte posterior llevarán una inscripción a lápiz que permita identificarlas. Cada figura tendrá una leyenda explicativa. Debe evitarse la superposición de tablas y figuras.

La *bibliografía*, presentada en hoja aparte, deberá limitarse a aquellos artículos directamente relacionados con el trabajo mismo, evitándose las revisiones bibliográficas extensas que sólo serán aceptables en la sección *Adelantos en Medicina*. Las referencias se presentarán numeradas, en orden alfabético de autores *con los títulos de las publicaciones.* Los nombres de la revista figurarán en forma abreviada según el Index Medicus (ej.: J. Clin. Pathol. 19: 391, 1960). Los libros deberán figurar con su título, editor, ciudad y año de aparición.

Resumen: El trabajo deberá presentar un resumen de unas 200 palabras. *Además, contendrá un resumen más explicativo (de hasta 700 palabras) en inglés, con su título completo y con referencias a las figuras y tablas.*

Con motivo del constante aumento de los costos de edición, la Revista se hará cargo solamente de la impresión de 4 páginas (incluyendo tablas y figuras) para cada artículo original. Los autores deberán abonar los gastos que demande la mayor extensión de sus trabajos. El Comité de Redacción se reserva el derecho de solventar totalmente aquellos artículos de investigación clínica que considere de especial interés.

Se ruega enviar dirección postal y número de teléfono particular para facilitar el envío de pruebas de galera.

Secretaría y Redacción (de 8.30 a 17 hs.): Ana G. de Delisio, Instituto de Investigaciones Médicas, Donato Alvarez 3150, 1427 Buenos Aires. T. E. 52-0061/64.

Suscripción			
	Argentina	$	140.000
	Con cobrador a domicilio	$	155.000
	Números sueltos	$	30.000
	Extranjero	u$s	35

Correo Argentino — Central "B" — Franqueo pagado, Concesión Nº 856 — Tarifa reducida, Concesión Nº 666

Publicidad: Dr. Horacio J. Delisio, T. E. 52-0061/64
Sra. Nélida B. de Pecoraro

Las suscripciones corresponden de enero a diciembre de cada año. Los pagos se podrán hacer personalmente o por correo con cheque o giros a la orden de **Fundación Revista Medicina.**

Impreso en ZLOTOPIORO S.A.C.I.F., Sarmiento 3149 - Bs. Aires, Argentina

Distinguido Doctor

Tenemos el agrado de anunciar al cuerpo médico argentino la presentación de FLOVACIL, nueva especialidad medicinal de Laboratorios Andrómaco, cuyo principio activo es el DIFLUNISAL.

Este novedoso analgésico antiinflamatorio, derivado del ácido salicílico, aporta por su mayor potencia, excelente tolerancia y acción más prolongada, un real avance en el tratamiento de todo proceso doloroso.

Podemos afirmar que FLOVACIL es, en términos de eficacia y seguridad, el salicilato analgésico antiinflamatorio, probadamente superior.

Flovacil se presenta en envases de 10 y 40 comprimidos recubiertos conteniendo cada uno 500 mg de Diflunisal, siendo la dosis de orientación de 500 a 1000 mg al día.

Quedamos a su disposición para ampliar la presente información y aprovechamos la oportunidad para saludar a Ud. muy atentamente.

Servicio de Información del Departamento Médico de Laboratorios Andrómaco

Halopidol

JANSSEN

de elección
en pacientes ancianos,
agresivos, agitados
y negativistas

(5 gotas tres veces por dia)

Producido bajo licencia de
JANSSEN PHARMACEUTICA n. v.
Beerse, Bélgica

Elaborado por:
Johnson & Johnson
de Argentina S.A.C. e I.
Darwin 471 - Buenos Aires

ISSN 0025-7680

MEDICINA

BUENOS AIRES

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

ARTICULOS ORIGINALES

CASUISTICA

REUNION ANATOMOCLINICA

ADELANTOS EN MEDICINA

ARTICULO ESPECIAL

EDITORIALES

CARTAS AL COMITE DE REDACCION

★ en inglés.

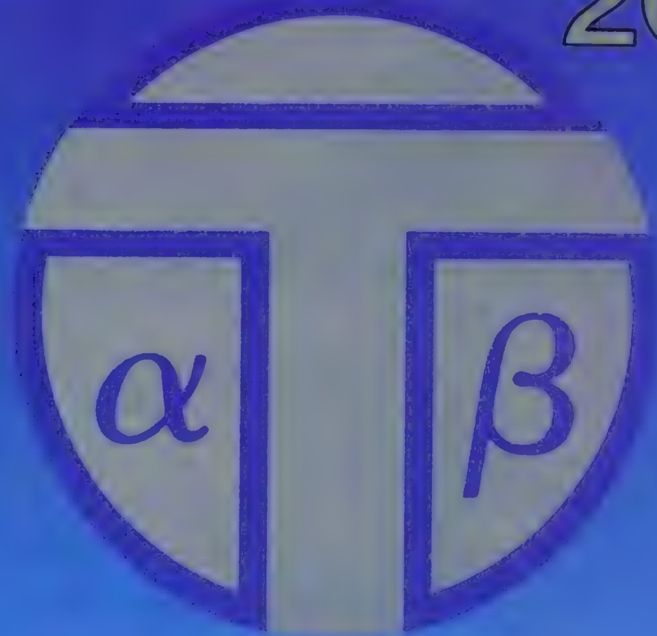
VOL. 41, Nº 3 1981

HIPERTENSION

Nuevo concepto

TRANDATE 200

(labetalol)



Unica monodroga α β bloqueante
de acción simultánea

Glaxo

Precio al público al 22/4/81 - Trandate 100 mg por 20 comp. $ 30.649;
100 mg por 50 comp. $ 73.003; 200 mg por 20 comp. $ 58.298; 200 mg por 50 comp. $ 139.925.

La decisión en Ajedrez: el Rey.
La decisión en Aminoglucósidos

Baymicina®

(Sisomicina Bayer)

Hasta 4 veces más eficaz que gentamicina

PRESENTACIONES:

Como Solución al 5%

Baymicina® 100: envase de 2 ampollas de 2 ml. con 100 mg. de sisomicina cada una.

Baymicina® 75: envase de 2 ampollas de 1,5 ml. con 75 mg. de sisomicina cada una.

Baymicina® 50: envase de 2 ampollas de 1 ml. con 50 mg. de sisomicina cada una.

Como Solución al 1%

Baymicina® 20: envase de 2 ampollas de 2 ml. con 20 mg. de sisomicina cada una.

Baymicina® 10: envase de 2 ampollas de 1 ml. con 10 mg. de sisomicina cada una.

Bayer Argentina S.A.
División Farma
Empedrado 2435 - Buenos Aires/Argentina

Precio indicativo al público envase x 2 ampollas de 10 mg. $ 9.757.- (al 17.2.81)

MEDICINA

BUENOS AIRES

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

ORIGINAL ARTICLES

CASE REPORT

CLINICOPATHOLOGICAL CONFERENCE

ADVANCES IN MEDICINE

SPECIAL ARTICLE

EDITORIALS

LETTERS TO THE EDITOR

— — — —

★ in English.

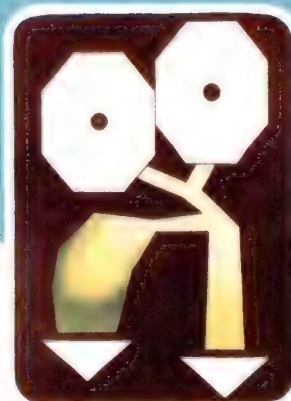
VOL. 41, Nº 3 1981

Para corregir la dispepsia hepatobiliar y prevenir la litiasis

SoluTraT®

Acido Ursodesoxicólico

Potente y único colerético antilitogénico fisiológico



Aumenta la secreción biliar por un mecanismo natural y mantiene su composición cualitativa dentro de los límites fisiológicos.

Corrige el disbalance ácidos biliares/colesterol.

Evita la formación de bilis litogénica.

Restituye y normaliza las funciones digestivas alteradas.

Resuelve de manera integral la sintomatología de los procesos dispépticos hepatobiliares sin riesgo de secundarismos.

Redisuelve los microcristales de colesterol y retrograda las concreciones biliares radiotraslúcidas.

FORMULA:

Cada comprimido de **SOLUTRAT 50 mg** contiene:
Acido ursodesoxicólico .... 50 mg

Cada comprimido de **SOLUTRAT 150 mg** contiene:
Acido ursodesoxicólico .... 150 mg

INDICACIONES:

Dispepsia hepatobiliar y sus manifestaciones clínicas.
Trastornos cuali-cuantitativos de la secreción biliar: enfermedades hepáticas, afecciones de las vías biliares.
Riesgo litogénico.

POSOLOGIA:

1 a 2 comprimidos de 50 mg 3 veces por día; o bien: 1 comprimido de 150 mg 2 veces por día, con las ingestas principales.

PRESENTACION:

SOLUTRAT 50 mg: Envases con 20 y 50 comprimidos laqueados.
SOLUTRAT 150 mg: Envases con 20 y 50 comprimidos laqueados ranurados.

Labinca

esfuerzo argentino
para una salud mejor

Precio con IVA al público al 27/4/81
SOLUTRAT 50 mg x 20 compr. $ 27.967
SOLUTRAT 50 mg x 50 compr. $ 66.034
SOLUTRAT 150 mg x 20 compr. $ 45.991
SOLUTRAT 150 mg x 50 compr. $ 121.193

TRIFACLOX

Ampicilina+dicloxacilina

LA TERAPIA BIBACTERICIDA
DE AMPLIA COBERTURA ANTIBIOTICA

Investigación y Tecnología Argentina

MARCA DE FABRICA

Motilium

JANSSEN

gastrocinetico

1 Activa el peristaltismo duodenal:

la comida procedente del estómago es recogida y procesada adecuadamente.

2 Relaja el píloro:

más comida llega al duodeno.

3 Aumenta la actividad del antro:

la comida es mezclada mejor y transportada adecuadamente hacia el píloro.

4 Contrae el cardias:

el camino de retorno está cerrado. La comida no puede regresar.

MARCA DE FABRICA

Motilium
JANSSEN

gastrocinético

información para la prescripción

Definición: La sustancia activa de Motilium es Domperidone (R 33812), una síntesis original de los Laboratorios de Investigación de Janssen Pharmaceutica de Bélgica.

Propiedades: Motilium normaliza la motilidad y el vaciamiento gástrico, careciendo de efectos colaterales, neurológicos o psicotrópicos.

Indicaciones: Trastornos relacionados con una evacuación gástrica deficiente, tales como: distensión abdominal, sensación de plenitud después de las comidas, incapacidad para terminar una comida normal, dolor epigástrico, aerofagia/eructos, pirosis/acidez, regurgitación, náuseas/vómitos y patología funcional pediátrica.

Posología y administración:

Dispepsia

Adultos: Un comprimido o 30 gotas (1ml) 3 veces por día, 15 a 30 minutos antes de las comidas.

Niños: Una gota (0,3 mg) por kilo de peso 3 veces por día, 15 a 30 minutos antes de las comidas.

Dispepsia asociada con náuseas y/o vómitos

Adultos: Dos comprimidos o 60 gotas (2 ml), 3 a 4 veces por día.

Niños: Una gota (0,3 mg) por kilogramo de peso 3 a 4 veces por día.

Ante intolerancia oral o cuadro agudo:
0,1 mg/kilogramo de peso, por vía intramuscular o intravenosa de 1 a 6 veces por día.

Observaciones: Se aconseja diluir las gotas en algún líquido mezclando bien antes de la administración.

Contraindicaciones: La ausencia de efectos colaterales neurológicos con Motilium es debido al hecho de la casi nula penetración de la droga en la barrera hematoencefálica.
Sin embargo, dado que en los primeros meses de vida las funciones metabólicas y las funciones de la barrera hematoencefálica no están totalmente desarrolladas, la aparición de efectos neurológicos no puede estar totalmente excluida en niños menores de 1 año, por lo que no se aconseja su uso en dicho grupo etario.
A pesar de no haberse observado efectos teratogénicos o embriotóxicos en estudios con animales, se contraindica el uso de Motilium en mujeres embarazadas.

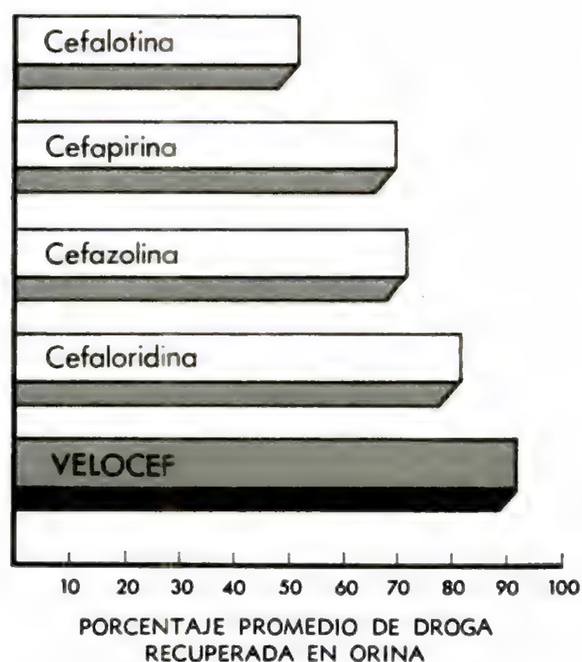
Presentaciones:
Comprimidos: Estuches conteniendo 20 y 40 comprimidos con 10 mg de Domperidone cada uno.
Gotas al 1%: Frasco gotero conteniendo 20 ml con 10 mg de Domperidone/ml (0,3 mg por gota).
Ampollas: Estuche conteniendo 5 ampollas de 2 ml (5 mg de Domperidone/ml).

Producido bajo licencia de
JANSSEN PHARMACEUTICA n v
Beerse, Bélgica

Elaborado por
Johnson & Johnson
de Argentina S A Comercial e Industrial
Darwin 471 - Buenos Aires

Precio al Publico al 1-6-81
Comprimidos x 20 $ 36.443.-; comp. x 40 $ 69.959.-
Solucion x 20 cc. $ 34.140.-; iny. de 2 ml. x 5 amp. $ 47.920.-

Concentración activa:
Cefradina pasa al tracto urinario inferior sin metabolizarse, siendo activa contra los agentes patógenos aun en la vejiga.



VELOCEF posee el mayor grado de recuperación y la menor unión proteica.

Penetración efectiva:
La curación o mejoría de los pacientes es, finalmente, el parámetro definitorio.

Porcentaje de pacientes curados o mejorados

	Nº PACIENTES	ORAL	Nº PACIENTES	INY.
Cistitis aguda	775	97 %	58	98 %
Cistitis crónica	182	92 %	19	95 %
Pielonefritis aguda	276	94 %	145	96 %
Pielonefritis crónica	118	88 %	39	92 %
Bacteriuria asintomática	23	91 %	3	100 %
Prostatitis	17	94 %	2	100 %
Uretritis no gonocóccica	9	89 %	1	100 %
Orquiepididimitis	7	100 %	—	—
Infecc. inespecíficas del tracto urinario	517	92 %	54	93 %

VELOCEF
(cefradina)
El factor decisivo

PRECIO PUBLICO CON I.V.A. AL 12-5-81

CAP.: 250 mg x 8 $ 24.248.—, 250 mg x 16 $ 44.582.—, 500 mg x 8 $ 43.490.— y 500 mg x 16 $ 79.482.—; COMP.: 1 g x 8 $ 79.482.—; INY.: 250 mg $ 12.268.—, 500 mg $ 23.327.— y 1000 mg $ 40.849.—; SUSP.: 250 mg x 60 ml $ 36.592.— y 250 mg x 120 ml $ 66.882.—.

SQUIBB

Karidium®

Cuando la ansiolisis no debe afectar las actividades cotidianas.

30, 60 y 120 comprimidos

Karidium® 20

Cuando síntomas más pronunciados como insomnio, excitabilidad y otros, requieren ansiolisis sin miorrelajación

30 y 60 comprimidos

Hoechst

cla

foran

Espectro muy superior al de las cefalosporinas y penicilinas semisintéticas disponibles

Actividad que desafía a la de los aminoglucósidos

Resistencia a las β-lactamasas no sobrepasada

La clásica seguridad de las cefalosporinas

Altos niveles en plasma y orina

Porcentajes remarcables de curación clínica en infecciones severas

claforan

nuevo antibiótico de máxima potencia

COMPOSICION: CLAFORAN es Cefotaxime sódico (250 mg; 500 mg; 1 g; 2 g ... una nueva molécula antibiótica con el más amplio espectro bactericida frente ... gérmenes gram positivos, gram negativos y anaerobios.

PROPIEDADES: CLAFORAN ha demostrado su actividad mediante pruebas in vitro frente a los gérmenes: estafilococos, estreptococos (el Streptococcus faecalis es poco sensible), Streptococcus pneumoniae, Escherichia Coli, Citrobacter, Klebsiellas, Enterobacter sp., Serratia, Proteus (indol positivos e indol negativos), Providencia sp., Haemophilus influenzae, Neisseria. Menos sensibles: Pseudomonas aeruginosa y Bacteroides fragilis.

INDICACIONES: CLAFORAN está indicado en aquellas infecciones simples a mixtas producidas por cepas sensibles de los gérmenes anteriormente citados, tales como infecciones de las vías respiratorias, infecciones urinarias, sepsis, endocarditis, meningitis, infecciones óseas, de las articulaciones, tejidos blandos y de la piel, infecciones de la cavidad abdominal (peritonitis, infecciones de las vías biliares y del tracto gastrointestinal), infecciones otorrinolaringológicas, quemaduras o heridas infectadas, infecciones de los órganos genitales, infecciones en ginecología y obstetricia.

POSOLOGIA Y MODO DE EMPLEO

- Vía intramuscular (CLAFORAN 1000 · CLAFORAN 500 y 250)

  Disolver el CLAFORAN en su ampolla de solvente e inyectar profundamente en la región glútea.

- Vía intravenosa (CLAFORAN 2000; CLAFORAN 1000 · CLAFORAN 500 y 250)

  Disolver el CLAFORAN en su ampolla de solvente y después
  - ya sea inyectar la solución por vía endovenosa directa, lentamente en la vena o en la tubuladura de la perfusión.
  - o utilizar la solución en perfusión continua o discontinua de una duración de 20 a 60 minutos.

La posología, la vía de administración y el ritmo de las inyecciones se eligen en función de la naturaleza y de la severidad de la infección, del estado del enfermo, así como de la sensibilidad de los gérmenes al cefotaxime.

En el adulto:

- La posología usual es de 2 g por día, en 2 inyecciones de 1 g.
- En los casos más severos, esta dosis se aumentará a 3 ó 4 g por día en 2 a 4 inyecciones.
- En los casos sumamente severos, la dosis podrá alcanzar por vía venosa, 12 g por día.

En el niño y en el lactante:

- La dosis cotidiana habitual es de 50 a 150 mg/kg, repartida en 2 a 4 inyecciones.
- Excepcionalmente, la posología diaria puede alcanzar 200 mg/kg.
- La administración en el prematuro está en curso de estudio.

Hasta que se establezca la posología, se recomienda no sobrepasar la dosis de 50 mg/kg/día, en razón de la inmadurez renal.

En el insuficiente renal:

La posología se ajustará modificando, ya sea la dosis unitaria, ya sea el ritmo de las inyecciones, teniendo en cuenta los niveles séricos del antibiótico, la depuración de la creatinina o la creatinina sérica. En pacientes con clearance de creatinina menor de 20 ml/min, la dosis total diaria de Claforan debe disminuirse a la mitad.

PRECAUCIONES DE EMPLEO

- Interrumpir el tratamiento en caso de reacción alérgica.
- Adaptar la posología en caso de insuficiencia renal orgánica o funcional.
- La asociación de medicamentos potencialmente nefrotóxicos y de diuréticos poderosos deberá tener en cuenta los riesgos debidos a estos medicamentos.
- En mujeres embarazadas.

EFECTOS INDESEABLES

- Reacciones locales: se han señalado flebitis después de inyecciones endovenosas ... dolor en el punto de inyección en las inyecciones intramusculares.
- Reacciones generales: se han observado casos de erupción cutánea, de fiebre, o ... eosinofilia, de diarrea, de leucopenia transitoria, de elevación pasajera de la ... transaminasas TGO y TGP y de las fosfatasas alcalinas.
- La asociación con aminoglucósidos como así también con polimixina B y colistina aumenta la nefrotoxicidad de los mismos.

INTERACCION CON LAS PRUEBAS BIOLOGICAS

Se puede obtener una reacción falsamente positiva cuando se investiga la glucosa en ... orina con sustancias reductoras, pero ello no ocurre cuando se utilizan los métodos específicos con la glucosa-oxidasa.

Puede producir alteración de las pruebas de Coombs.

ADVERTENCIAS Y RECOMENDACIONES

- En los sujetos hipersensibles a la penicilina, la utilización del CLAFORAN debe ser prudente, siendo necesaria una vigilancia médica estricta desde la primera inyección.
- En la mujer embarazada, la seguridad de empleo no ha sido establecida, a pesar de que en ... experimentación animal no se ha puesto en evidencia efecto teratogénico.
- No se debe mezclar el CLAFORAN con ningún otro antibiótico en la misma jeringa o la misma perfusión.
- Utilizar la preparación extemporánea. La estabilidad de una solución de cefotaxime en ... soluciones de perfusión (isotónica de Cl Na, glucosa al 5%, solución de Ringer) es satisfactoria durante 24 horas en la heladera y 12 horas a temperatura no mayor de 23°C.
- Conservar los frascos de CLAFORAN al abrigo de la luz y el calor.

CONTRAINDICACIONES

Está contraindicado en los sujetos alérgicos a las cefalosporinas. Puede existir alergia cruzada con la penicilina.

EFECTOS TOXICOS, ANTAGONISMOS, ANTIDOTISMOS

No se conocen.

ROUSSEL

Avellaneda 2202 - (1636) OLIVOS (B.A.) - 791-8011/16 y 9041/...

 ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 273-286 (1981)

TRATAMIENTO DE LA ESTENOSIS BENIGNA DEL ESOFAGO POR MEDIO DE LA DILATACION PROLONGADA

P. A. MAZURE, J. C. CHIOCCA, GRACIELA B. SALIS

Servicio de Gastroenterología, Hospital Nacional A. Posadas, Haedo, Provincia de Buenos Aires

La estenosis benigna del esófago enfrenta a clínicos y cirujanos con una problemática de solución muy difícil y aun no decidida: la elección entre el tratamiento médico (o dilatador), y el tratamiento quirúrgico. En 1972 [73] en una comunicación preliminar dimos a conocer las características de un nuevo método de dilatación prolongada para el tratamiento de las estenosis benignas del esófago. El motivo de este trabajo consistió en evaluar los resultados obtenidos en la década 1970-1979 con la dilatación prolongada en las estenosis benignas del esófago en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Nacional A. Posadas.

Material y métodos

Entre los años 1970 y 1979 dilatamos 49 pacientes con estenosis benigna de esófago. Treinta y ocho de sexo masculino y 11 de sexo femenino. Las edades oscilaban entre los 14 y 83 años. Previamente los enfermos fueron interrogados siguiendo las pautas de un cuestionario *ad-hoc* respecto a los síntomas, forma de comienzo, patología asociada, etc. En el mismo se volcaron los resultados de los exámenes complementarios que luego detallaremos, así como los datos de seguimiento.

Recibido: 5-XII-1980. Aceptado: 2-IV-1981.

Dirección postal: Servicio de Gastroenterología, Hospital Nacional A. Posadas, Martínez de Hoz y Perdriel, 1706 Haedo, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Los estudios radiológicos de esófago y estómago con mezcla baritada se realizaron de pie, en decúbito y en ambas oblicuas determinando el calibre de la estenosis en milímetros.

La esofagoscopia, la efectuamos con endoscopios de fibra óptica modelos EFB y GIF-D2 Olympus, Eder-Hufford semirígido, y González Loza rígido. La citología exfoliativa se obtuvo por cepillado endoscópico o con el cepillo de Ayre. Los preparados fueron coloreados por el método de Papanicolaou; y los histológicos con hematoxilina-eosina según técnica.

Establecido el diagnóstico de benignidad de la estenosis por medio de la sistemática antes expuesta, procedimos a determinar su calibre introduciendo por vía peroral dilatadores metálicos de Sippy de distinto tamaño, de manera tal que el de mayor diámetro que franqueaba la estenosis sin esfuerzo se tomaba como calibre real. A este valor expresado en milímetros, se lo denominó "calibración" de la estenosis.

Una vez finalizada la dilatación habiéndose reestablecido el calibre esofágico adecuado, determinamos los siguientes parámetros: 1) calibre de la estenosis en milímetros comprobado por radiología; 2) "calibración" de la estenosis por medio de las olivas metálicas de Sippy; 3) acidimetría gástrica con dosis de histamina máxima según técnica de Kay [57]; 4) determinación del reflujo gastroesofágico según técnica de Tuttle [119]; 5) capacidad de depuración de ácido clorhídrico instilado en esófago según técnica de Booth [14]; 6) electromanometría (EMM) esofágica según técnica original de Code [23] modificada por Pope [89] y Stef [106].

Luego del alta, los pacientes fueron entrevistados cada 3 meses en consultorio externo procediéndose a evaluar su sintomatología esofágica. Cada 6 meses se procedió a obtener una radiografía de esófago de control, y a "calibrar" la estenosis. La esofagoscopia se repitió cuando la clínica así lo indicaba, si bien en los últimos meses del estudio comenzamos a hacerla sistemáticamente en búsqueda de carcinoma de esófago. Los

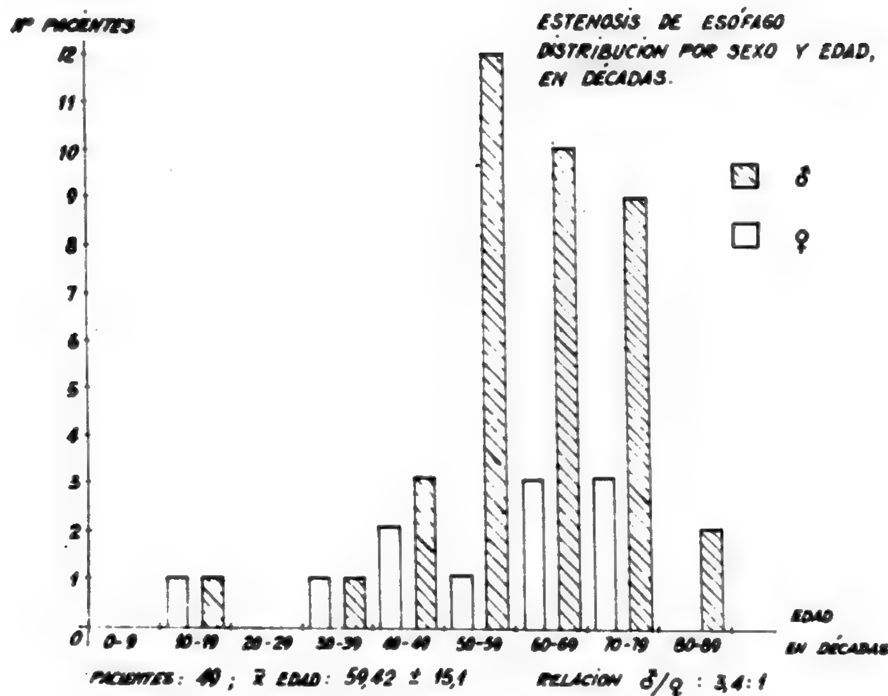


Fig. 1. — Distribución de los pacientes por sexo y edad en décadas.

pacientes recibieron tratamiento médico consistente en: 1) dieta hipograsa exenta de cafeína, aconsejándose asimismo evitar el uso de nicotina; 2) elevación de 20 centímetros de la cabecera de la cama; 3) hidróxido de aluminio y trisilicato de magnesio 20 centímetros cúbicos 1 hora después del desayuno, almuerzo, merienda y cena; 4) clorhidrato o bromuro de metoclopramida [65] 20 mg después de almuerzo de cena, y 5) alginatos [72] en dosis de 2 tabletas antes de acostarse. Este tratamiento se instituyó durante 3 meses, manteniendo luego solamente los antiácidos, dieta y elevación de la cabecera de la cama.

Si durante el curso del seguimiento observábamos recidiva de la estenosis, procedíamos a redilatar con el método antes descripto. Si sobrevenía una segunda recidiva se enviaba el paciente a cirugía correctora del reflujo, previa dilatación.

Los resultados del tratamiento fueron definidos como: 1) excelente; 2) bueno, y 3) malo. Adjudicamos resultados excelentes a aquellos pacientes en los cuales desapareció el síntoma disfagia orgánica y cuyo calibre de esófago (determinado por "calibración") fue restituido a 13 o más milímetros. Cuando los pacientes manifestaron disfagia orgánica en forma intermitente y pudieron deglutir de manera cercana a lo normal y el calibre del esófago era de 10-12 mm se clasificó el resultado como bueno. Se consideraron los resultados como malos, cuando la disfagia persistió sin modificaciones y el calibre del esófago fue menor de 10 milímetros. Las muestras se analizaron según el método de la F de Snedecor y la t de Student [104].

Resultados

Fueron dilatados 49 pacientes, de los cuales 38 (77.5 %) eran de sexo masculino y 11 (22.4 %) de sexo femenino; la relación hombre/mujer fue 3.4 : 1. El rango de edad fue de 14 a 83 años y el promedio 59.4 ± 15.1 años. En la Figura 1 vemos la distribución de los pacientes de acuerdo a edad en décadas y sexo. En la Tabla 1 vemos la frecuencia de los síntomas de estos pacientes.

La esofagitis por reflujo fue la etiología predominante (77.5 %) de la estenosis, si-

TABLA 2. — *Frecuencia de síntomas en la estenosis de esófago*

Síntomas	Nº pacientes	%
Disfagia	49	100
Acidez	31	63.2
Pirosis	31	63.2
Ardor retroesternal	24	48.9
Pérdida de peso	19	38.7
Sialorrea	15	30.6
Afagia	12	28.4
Regurgitación	8	16.3
Vómito	7	14.2
Neumopatía aspirativa	3	6.1
Hematemesis y melena	2	4
Anorexia	2	4
Astenia	2	4

guiéndole en orden de frecuencia la estenosis por sonda (6.1 %), la esclerodermia (4 %), la estenosis post-quirúrgica (4 %), el "esófago corto congénito" (2 %), la "esofagitis alérgica" (2 %), la compresión extrínseca (2 %), y un caso secundario a la colocación de un botón de Vosschulte por várices esofágicas sangrantes (2 %). La estenosis se hallaba confinada al tercio inferior del esófago en la mayoría de los pacientes (89.7 %), tomó el tercio medio e inferior en 6.1 % y el tercio medio y tercio superior en 2 % de los casos, respectivamente. Como se desprende de la Tabla 2, la hernia hiatal por deslizamiento constituyó la patología asociada con más frecuencia a la estenosis.

Previo a la dilatación, el calibre de la estenosis esofágica determinado por radiología fue de un promedio de 6.5 ± 3.8 mm (rango: 1-14), mientras que la "calibración" fue de un promedio de 8.8 ± 3.8 mm (rango 1-14). El tiempo de intubación, o sea el lapso durante el cual el paciente tuvo un determinado número de días el dilatador colocado dentro de la estenosis, fue de un promedio de 4.4 días (rango: 1-18). El número promedio de dilataciones a que fue sometido cada paciente fue de 3.7 (rango: 1-8). El promedio insumido para llegar a un calibre de esófago aceptable (en otras palabras desde que se colocó el primer dilatador hasta que se retiró el último) fue de 16.1 días (rango: 1-260).

TABLA 2. — *Patología asociada a la estenosis de esófago*

Patología	Nº pacientes	%
Hernia hiatal	22	44.8
Hernia hiatal + úlcera esófago	9	18.3
Hernia hiatal + úlcera duodeno	5	10.2
No patología	2	4
Hernia hiatal + esclerodermia	1	2
Hernia hiatal + Ca. gástrico	1	2
Hernia hiatal + úlcera esófago + úlcera duodeno	1	2
Hernia hiatal + úlcera gástrica	1	2
Hernia hiatal + úlcera esófago + esclerodermia	1	2
Hernia hiatal + úlcera esófago + Cáncer mama	1	2
Hernia hiatal + úlcera esófago + litiasis vesicular	1	2
Ulcera duodeno	1	2
Cirrosis	1	2
Carcinoma gástrico	1	2
Compresión extrínseca (fibrosis mediastino)	1	2

El calibre de la estenosis medido por radiología con posterioridad a la dilatación fue $\bar{x}$ 13.9 ± 2.8 mm (rango: 9-18), mientras que la "calibración" mostró $\bar{x}$ 14.9 ± 2.3 mm (rango: 5-18). A fin de determinar qué parámetro de los antes nombrados era el más fidedigno para evaluar el calibre de la estenosis, se compararon los resultados post-dilatación obtenidos por radiología y "calibración". Utilizando el método de la F de Snedecor se demostró que hay una diferencia estadísticamente significativa en favor de la "calibración" o sea que los valores obtenidos en nuestros pacientes (F. 10.1) fueron mayores que los de las correspondientes tablas (F: 4). Igual circunstancia se dio cuando el análisis se realizó por el método de la t de Student, dado que los valores del grupo en estudio (t: 3.1) fueron mayores que los de las correspondientes tablas (t: 2.4). De esta manera, pues, se determinó que el método más acertado para la medición del diámetro de la estenosis era la "calibración".

En la Figura 2 mostramos la comparación gráfica de los diámetros de la estenosis determinados por "calibración" con anterioridad y posterioridad a la dilatación.

Se realizó el estudio endoscópico del esófago en 44 pacientes (88.7 %), observándose que el diagnóstico más frecuente (72.7 %) fue estenosis benigna asociada a esofagitis. La biopsia de esófago se realizó en 46 pacientes. Pudimos apreciar que el diagnóstico más frecuente fue esofagitis (86.9 %) siguiendo en orden de frecuencia el epitelio de Barrett (6.5 %), material insuficiente (4.3 %) y epitelio normal (2.1 %). En 22 pacientes se realizó citología exfoliativa, la cual fue negativa para neoplasia en 100 % de los casos.

Determinamos el reflujo gastroesofágico en 10 pacientes demostrando la presencia de reflujo en 80 % de los casos. La capacidad de depuración de ácido clorhídrico fue detectada en 6 pacientes, demostrando esta prueba que el 100 % de los mismos eran incapaces de depurar el ácido instilado. La acidimetría gástrica fue realizada

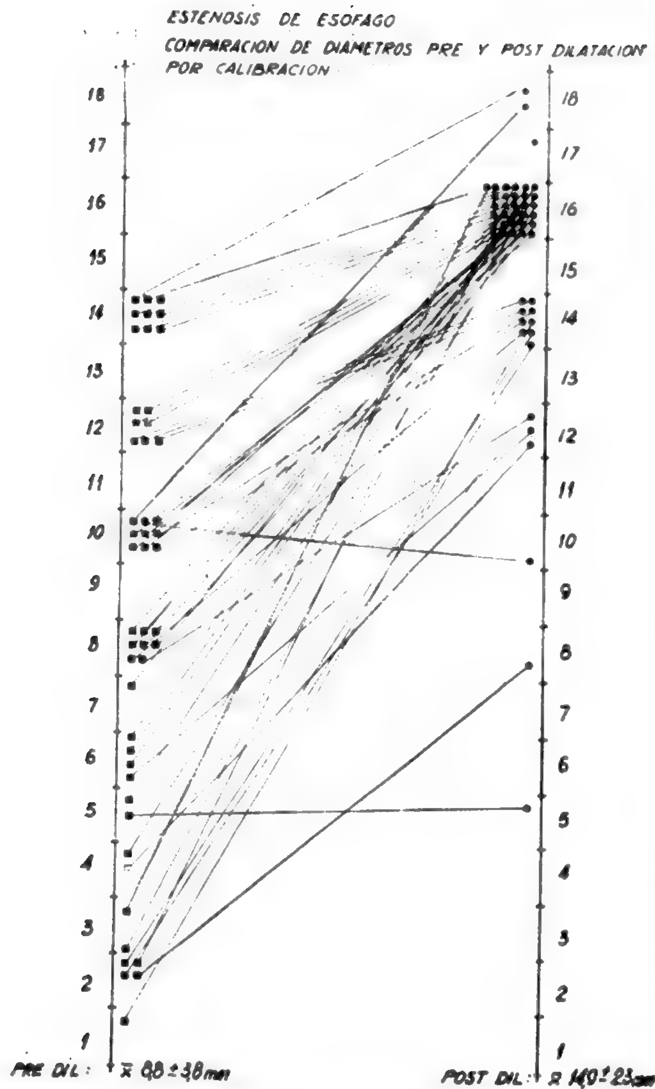


Fig. 2. — Comparación gráfica del diámetro de la estenosis determinado por "calibración" previa y con posterioridad a la dilatación.

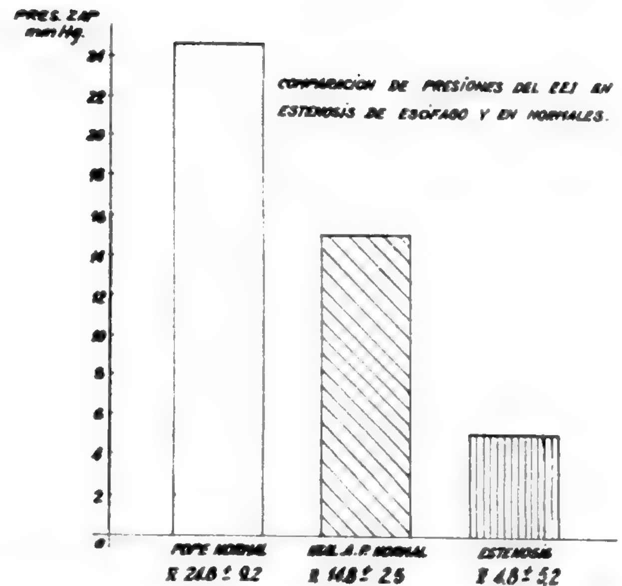


Fig. 3. — Comparación gráfica de las presiones del EEI en pacientes con estenosis de esófago y en normales.

en 22 casos, mostrando cifras basales de $\bar{x}$ 2.5 mEq/h (rango: 1-8.9). Los valores post-histamina fueron $\bar{x}$ 17.3 mEq/h (rango: 2-35). De éstos, un 40.9 % mostró un patrón de hipersecreción.

La electromanometría se realizó en 24 pacientes. Este estudio mostró que las presiones del esfínter esofágico inferior (EEI) eran: $\bar{x}$ 4.8 $\pm$ 5.2 mm Hg (rango: 0-19.5). En la Figura 3 se comparan las presiones del EEI de los pacientes estenosados con las de los normales obtenidas en nuestro laboratorio [101] y en el de Pope [90].

En 43 pacientes (87.7 %) los resultados de la dilatación fueron excelentes, con una probabilidad (p) de 0.877; en 4 pacientes (8.1 %) buenos, con una probabilidad (p) de 0.081, y en 2 pacientes (4 %) malos, con una probabilidad (p) de 0.040.

Quince pacientes (30.6 %), experimentaron intolerancia a la dilatación manifestada por náuseas, vómitos o sialorrea. Se observó recidiva de la estenosis en 17 pacientes (34.6 %), que apareció con un promedio de 6.2 meses después de finalizada la dilatación. Estos pacientes fueron dilatados nuevamente. De ellos, 9 siguieron bien hasta la fecha, mientras que los 8 restantes fueron sometidos a tratamiento quirúrgico por aparición de una segunda recidiva. El seguimiento de los 49 pacientes se realizó durante un promedio de 27.3 meses (rango: 1-132).

La morbilidad por el tratamiento dilatador fue de 6.1 %, observándose hematemesis en 1 paciente, lesiones por decúbito en la faringe debidas al dilatador en 1 paciente, y perforación del esófago cervical en 1 paciente. La mortalidad producida por este tratamiento fue de 1 paciente (2 %) con perforación del esófago cervical.

Ocho pacientes fueron sometidos a tratamiento quirúrgico por presentar dos recidivas de la estenosis. A 5 de ellos se les realizó operación de Nissen (3 por vía torácica y 2 por vía abdominal); los 3 pacientes operados por tórax fallecieron por complicaciones en el post-operatorio inmediato. mientras que los operados por abdomen están bien hasta la fecha. Un paciente fue sometido a antrectomía e interposición de Y de Roux y falleció en el post-

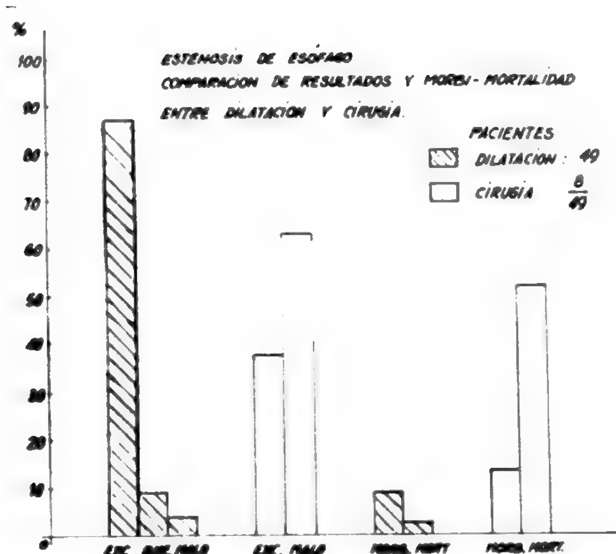


Fig. 4. — Experiencia personal, comparación gráfica de resultados, morbimortalidad, en dilatación y cirugía de la estenosis de esófago.

operatorio inmediato de complicación cardiopulmonar .Un paciente fue sometido a operación de Thal-Nissen y tuvo una fístula esofágica y empiema pleural. El octavo paciente fue sometido a funduplicatura a lo Santy-Michaud y está asintomático al presente. Los resultados de la cirugía fueron por lo tanto excelentes en 37.5 % (3 casos), y malos en 62.5 % (5 casos). La morbilidad quirúrgica fue del 12.5 % (1 caso), mientras que la mortalidad fue del 50 % (4 casos). En la Figura 4 hacemos una comparación entre el tratamiento dilatador y quirrúgico considerando resultados finales, morbilidad y mortalidad.

Discusión

La estenosis benigna del esófago nos enfrenta con una variedad de problemas de difícil solución. Esta entidad presenta una serie de facetas que hemos de analizar, comparando nuestros resultados con aquellos obtenidos de la literatura. Esta patología la vemos en forma predominante en pacientes de edad avanzada, con promedios de 51.5 a 69 años, y con mayor frecuencia en el sexo masculino [39, 41, 44, 62, 94, 98, 122]. La estenosis se localiza en la mayoría de los casos en el tercio inferior del esófago [32, 94]. La mayor parte de los trabajos publicados refieren grupos similares al nuestro en número [16, 39, 44, 62, 69, 94, 98, 118]. Constituyen una excepción los trabajos de Benedict [7] y Pearson [87] con más de 200 casos.

Es indudable que el componente común de la estenosis es la hernia hiatal si bien no debemos considerarla aislada sino como un complejo patológico constituido por hernia hiatal-reflujo gastroesofágico-úlcera de esófago-esofagitis-estenosis de esófago. Es importante destacar que el factor más significativo de este complejo lo constituye la enfermedad reflujo. Es difícil establecer la frecuencia de hernia hiatal en la población general. En algunos estudios radiológicos se la encuentra entre el 29.6 % y el 50 % de los pacientes examinados [105, 92] Naef [77] encuentra un 62.5 % de hernias hiatales entre 6388 esofagoscopías. En pacientes con estenosis de esófago, la frecuencia de hernia hiatal varía entre el 60 % y 94 % [9, 88, 94, 105, 122], cifras que son similares a las nuestras. La incidencia de esofagitis es variada en los adultos dado que se la ha citado como ocurriendo entre el 10 % y el 54 % de pacientes con hernia hiatal [55, 77, 82, 122]. En nuestros pacientes encontramos esofagitis en el 86.9 % de los biopsiados; debemos tener en cuenta que el grupo en cuestión representa la máxima expresión de la enfermedad reflujo (o sea la estenosis esofágica), razón por la cual es explicable una incidencia tan elevada de esofagitis. En los niños la esofagitis parece ocurrir con mayor frecuencia, dado que Belsey [6] menciona haberla visto en un 85 % de pacientes con hernia hiatal. El reflujo gastroesofágico ha sido detectado en 38 % en estudios radiológicos [92]. La frecuencia de la estenosis parece ser muy variada, pero en general en aquellos pacientes con hernia hiatal se la ve entre el 3 % y 37.9 % [55, 79, 82]; en los niños al igual que la esofagitis por reflujo, la estenosis parece ser más común, encontrándosela en un 45 % de las hernias hiatales [6]. En los pacientes con hernia hiatal se ha visto úlcera de esófago entre el 2.3 % y 13.1 % de los casos [79, 82]. Benedict [9] da cifras extremas del 40 % en pacientes con estenosis de esófago; nosotros la hemos visto en el 26.5 %. La estenosis por sonda es aparentemente muy poco frecuente, dado que Banfield [3] la encontró en un 1.5 %

de 189 casos de estenosis benigna de esófago. Nosotros la observamos con mayor frecuencia (6.1 %). Tuvimos un caso (2 %) de estenosis secundaria a la colocación de un botón de Vosschulte.

La estenosis benigna de esófago se asocia también a la esclerosis sistémica progresiva. La frecuencia en nuestro caso fue del 4 %, cifra similar al 5 % encontrado por Barrett [4]. Se sabe que el paciente con hernia hiatal y esofagitis es considerado de alto riesgo como candidato a padecer de cáncer de esófago. Palmer [82] lo cita en 0.6 % de pacientes con hernia hiatal, mientras que Pearson [88] da cifras de 2.4 %, Olaciregui [79] da una frecuencia de 9.3 % de cáncer de esófago en pacientes con esofagitis por reflujo. En nuestra casuística no hemos observado tal asociación.

El esófago tapizado por epitelio cilíndrico, entidad descripta por Barrett [5] en 1950 ha ido ganando interés, ya que se lo describe cada vez con mayor frecuencia. Nosotros encontramos una incidencia del 6.5 %; en la literatura se lo cita entre el 0 % y el 53 % de los pacientes con hernia hiatal, esofagitis por reflujo, y estenosis de esófago [17, 25, 77, 79, 86, 115]. Al igual que la hernia hiatal, la esofagitis por reflujo y el síndrome de Plummer-Vinson, el epitelio de Barrett es considerado de alto riesgo para el cáncer de esófago. Se cita ocurrencia de 13 % de adenocarcinoma en esta entidad [17]. En una serie de 150 pacientes con esofagitis, 14 presentaron cáncer de esófago, de los cuales 2 (14.2 %) tenían epitelio de Barrett [79]. Nosotros no hemos observado tal asociación. Por último, cabe mencionar que se ha descripto al esófago tapizado con epitelio cilíndrico en asociación con anillos esofágicos [56], y con esclerosis sistémica progresiva [18].

La endoscopía es indudablemente un elemento de gran valor en la evaluación del complejo hernia hiatal-esofagitis-úlcera-estenosis. Kobayashi [60] clasifica endoscópicamente a las esofagitis en 4 grados y manifiesta haber encontrado una buena correlación con la histología en el grado 2, y menos en el grado 1. De Meester [27] estima que el valor de la endoscopía en el diagnóstico de la esofagitis es menor al encontrar que solamente el 56 % de pacientes con síntomas severos de reflujo gastroesofágico tenían evidencia endoscópica de esofagitis.

Desde hace tiempo es conocida la discordancia entre la endoscopía y la histología en el diagnóstico de la esofagitis. En 1970 y en 1974, Ismail-Beigi [53, 54] estableció el criterio mínimo para el diagnóstico histológico de la esofagitis. En 1974 Kobayashi [60] estima que el criterio histológico para el diagnóstico de la esofagitis consiste en un aumento de la altura de las papilas, del número de leucocitos, capilares, y células de la membrana basal; con infiltración de la lámina propia con neutrófilos, células plasmáticas y linfocitos. Utilizando este criterio, obtiene un 90 % de correlación histología-endoscopía en el diagnóstico de la esofagitis. Seefeld [100] en 1977, en contraposición con Ismail-Beigi concede importancia a la infiltración de la lámina propia con neutrófilos y eosinófilos; postura similar a la que había sostenido Palmer [83] en 1954. En nuestra experiencia la citología exfoliativa fue un elemento de importancia al descartar la presencia de neoplasia de esófago en la totalidad de los casos en que se realizó. Las cifras obtenidas por nosotros son iguales a las de Hishons [48]. El valor de la citología exfoliativa en el diagnóstico de neoplasia de esófago está bien establecido, ya que es capaz de dar positividad entre el 89 % y el 95 % de los casos [48, 121].

En la mayoría de los trabajos publicados se establece el diámetro de la estenosis del esófago solamente por medio de la imagen radiológica. Nosotros hemos demostrado que este método es falaz, y hemos descripto por primera vez a la "calibración" como medio de medición real del calibre de la estenosis. Creemos que la diferencia entre ambos métodos reside en la distorsión de la imagen radiológica producida por la distancia placa-tubo ("proyección coniforme"); y al fenómeno llamado seudoestenosis [4, 116], que disminuyen en forma irreal el diámetro del esófago.

La acidimetría gástrica en nuestros pacientes mostró un patrón de hipersecreción post histamínica en 40.9 % de los casos cuando se la comparó con los valores normales de nuestro laboratorio [71]. Algunos autores [79, 108] mencionan la ocurrencia de hiperclorhidria en pacientes con hernia hiatal con o sin estenosis de esó-

fago, mientras que otros [25, 88] no encuentran diferencia significativa entre individuos normales y pacientes con hernia hiatal y/o estenosis benigna de esófago. Quizás sea de importancia establecer la presencia del patrón de hipersecreción, a fin de considerar la posibilidad del uso de bloqueantes H_2 en el tratamiento de la esofagitis por reflujo [19, 20]. Realizamos determinaciones de reflujo gastroesofágico por pH-metría, y de depuración de ácido clorhídrico en un número relativamente pequeño de pacientes. Los resultados fueron positivos en un 80 % y 100 % de los estudios realizados, respectivamente. De Meester [27] prefiere el monitoreo del pH del esófago distal durante 24 horas en lugar de las pruebas antes mencionadas. El número de enfermos estudiados por nosotros es muy bajo y nos inhibe de emitir opinión en este tipo de patología. En cuanto al monitoreo prolongado del pH del esófago distal, carecemos de experiencia personal.

El papel que desempeña la electromanometría en pacientes con hernia hiatal y reflujo gastroesofágico, ha sido objeto de múltiples trabajos. Debido a la discordancia que se encuentra entre las presiones del esfínter esofágico inferior y síntomas severos de reflujo, De Meester [27] y Clark [22] creen que ésta por sí sola no demuestra reflujo por la simple presencia de un esfínter hipotenso. En lo que a la evaluación del tratamiento quirúrgico de la hernia hiatal respecta, se ha visto que con los distintos procedimientos [30, 38] se eleva la presión del EEI, pero este hecho no explica por sí la mejoría clínica, ni por qué los valores de presión del esfínter no suben a los niveles normales. Creemos que a casi 30 años de su introducción en la clínica gastroenterológica, la electromanometría, por la diversidad de técnicas empleadas arroja resultados a veces discordantes, razón por la cual debe ser sujeta a revisión y a estandarización apropiadas. En los pacientes de la presente serie, las presiones del EEI estuvieron muy por debajo de los valores normales de nuestro y de otros laboratorios [90, 101]. Observamos una correlación total con la presencia de hernia hiatal, esofagitis por reflujo y estenosis, por lo que creemos que la EMM es un elemento de valor pero no el único. Es evidente que esta prueba es capaz de determinar en forma clara la presencia de la condicionante del reflujo, o sea la hipotensión del esfínter esofágico inferior; pero, por supuesto no es índice directo de la presencia de reflujo. Para la determinación de esta patología contamos con otros elementos a los que ya se ha hecho mención.

El promedio de intubación que requirieron nuestros pacientes fue corto, al igual que el promedio de dilataciones, cuando los comparamos con otras publicaciones donde suben al doble [9], o aún más [82]. Vimos recidiva en la estenosis en poco más de un tercio de nuestros pacientes. Al intentar comparar nuestros resultados con lo ya publicado observamos que la información es poco precisa, si bien encontramos una referencia del 10 % de recurrencia [118]. La recidiva de por sí no habla en contra de la bondad del método de dilatación, es nada más que el producto de la persistencia de aquello que ocasionó la estenosis, o sea la enfermedad reflujo. Hemos tratado de correlacionar el resultado del tratamiento con el calibre de la estenosis y la duración de los síntomas previo al inicio de la dilatación, a fin de determinar la importancia del factor tiempo en la cuantía de la estenosis. No fue posible demostrar una correlación duración de la enfermedad/gravedad de la misma. La observación de Benedict [7] es concordante con la nuestra.

Es indudable que existe una controversia entre internistas y cirujanos respecto al tratamiento a aplicar en la estenosis benigna del esófago. Podemos decir que en el extremo de una gran gama de opiniones se encuentran los que proponen la dilatación a ultranza como Tucker [117, 118], Benedict [7, 8], y Puestow [93]. Se ha descripto una variedad de métodos de dilatación utilizados con mayor o menor éxito [10, 28, 35-37, 49, 50, 59, 66, 67, 81, 91, 93, 97, 98, 112, 117, 118]. Su gran profusión nos demuestra que este procedimiento no ha resuelto el problema. Los cirujanos en el otro extremo de la gama, favorecen algún tipo de resección [44, 52, 75, 79, 85, 86], pero no están totalmente de acuerdo en qué debe resecarse o en qué forma debe reconstituirse el

tránsito del canal alimenticio. Otros, proponen tratar la hernia hiatal omitiendo tratar la estenosis de esófago; mientras que otros sí lo hacen [6, 15, 44, 46, 63]. Por fin, están los más conservadores, que prefieren la dilatación con poca convicción y recurren a la cirugía cuando ésta falla [16, 42].

Terracol [111], expresa refiriéndose a las dilataciones de tipo intermitente que: "las tentativas de vencer la obstrucción con las dilataciones, en este caso están condenadas finalmente al fracaso, porque después de haberse logrado un transitorio y a menudo inconsistente aumento del diámetro de la luz, en realidad por ruptura de tejido cicatrizal, el resultado final es la nueva formación de una mayor cicatriz que empeora aun más la situación". El mismo autor [114] cita a Troisseau quien en forma incisiva manifiesta: "tarde o temprano estos pacientes mueren asesinados por las bujías". Se estima, pues, que las dilataciones efectuadas en forma brusca y momentánea no constituyen el ideal. Basados en este hecho, y a fin de evitar la perforación y la perpetuación de las dilataciones, algunos autores proponen en contraposición la dilatación lenta, progresiva y prolongada por varias horas, que actúa por decúbico [2, 49]. Terracol [113] menciona un sistema de colocación de tubos de goma o plástico en la estenosis, que permanecen por varios días o semanas. Auguste [2] con criterio similar propone "dejar el catéter *in situ* por media hora". Tucker en 1950 [117] modifica su dilatador retrógrado para adaptarlo a la dilatación prolongada y en 1951 [118] publica resultados exitosos en 57.1 % de sus casos. En 1971 Holdon [50] utilizando el criterio en cuestión, comenta haber intubado por vía quirúrgica a dos pacientes estenosados. Los resultados a corta data fueron buenos en lo que a la disfagia respecta, pero la estenosis recidivó.

Nosotros, en 1972, publicamos nuestra comunicación previa [73] y en 1973 Didcott [28] publicó un trabajo donde utiliza un método de fundamento similar al nuestro en un grupo de 9 pacientes. Si bien sus resultados son buenos, el seguimiento fue muy corto; personalmente estimamos que el método no es ideal, dado que el dilatador debe ser colocado por medio de endoscopía, con la resultante de una morbilidad elevada. Finalmente, en 1974 Rodríguez-Adrados [97] comunicó su experiencia en dilatación prolongada utilizando tallos de laminaria que se colocaron por vía endoscópica en 3 pacientes. Los resultaron fueron buenos, pero los seguimientos cortos, y como otros, adolece del defecto de que los dilatadores deben ser colocados bajo control endoscópico. Al analizar la totalidad de los métodos de dilatación a que hemos tenido acceso bibliográfico, vemos cifras que varían entre el 55 % y 100 % de resultados excelentes [7, 16, 28, 32, 82, 94, 118, 122]; con una morbilidad de 0 % al 77,7 % [1, 28, 69, 91, 94, 98, 122]; y una mortalidad del 0 % al 12 % [13, 94, 102, 122]. Nosotros, como expresáramos antes, tuvimos 87.7 % de resultados excelentes, morbilidad de 6.1 % y mortalidad de 2 %. Estimamos, entonces, que nuestro método en comparación con los otros está entre los que ofrece mejores resultados, y más baja morbimortalidad.

Es conveniente hacer un comentario acerca de la mortalidad quirúrgica en nuestros pacientes. Estos habían sido sometidos a innumerables dilataciones, y tenían estenosis sumamente fibrosas lo que hizo el manipuleo quirúrgico muy dificultoso. Si bien la mortalidad operatoria fue alta, estimamos que el número de pacientes fue pequeño como para emitir conclusiones definitivas. En el párrafo siguiente nos hemos de encontrar con un problema difícil, tal es el intentar confrontar los resultados, morbilidad y mortalidad de las publicaciones a que hemos tenido acceso (incluyendo nuestra experiencia) en lo que a dilatación y tratamiento quirúrgico de la estenosis benigna del esófago respecta. Decimos que esta tarea es difícil, por el hecho de que las publicaciones no guardan un criterio uniforme en la selección de pacientes, métodos de estudio y tratamiento, evaluación de resultados y seguimiento. Habiendo expresado esta salvedad creemos, no obstante, haber obtenido datos relativamente comparativos que pasamos a analizar.

En la que a resultados se refiere (Fig. 5) la dilatación [7, 16, 28, 62, 82, 122] ha arrojado cifras excelentes del 55 % al 100 % ($\bar{x}$ 74.3 %), y la cirugía [7, 12, 16, 33, 34, 41,

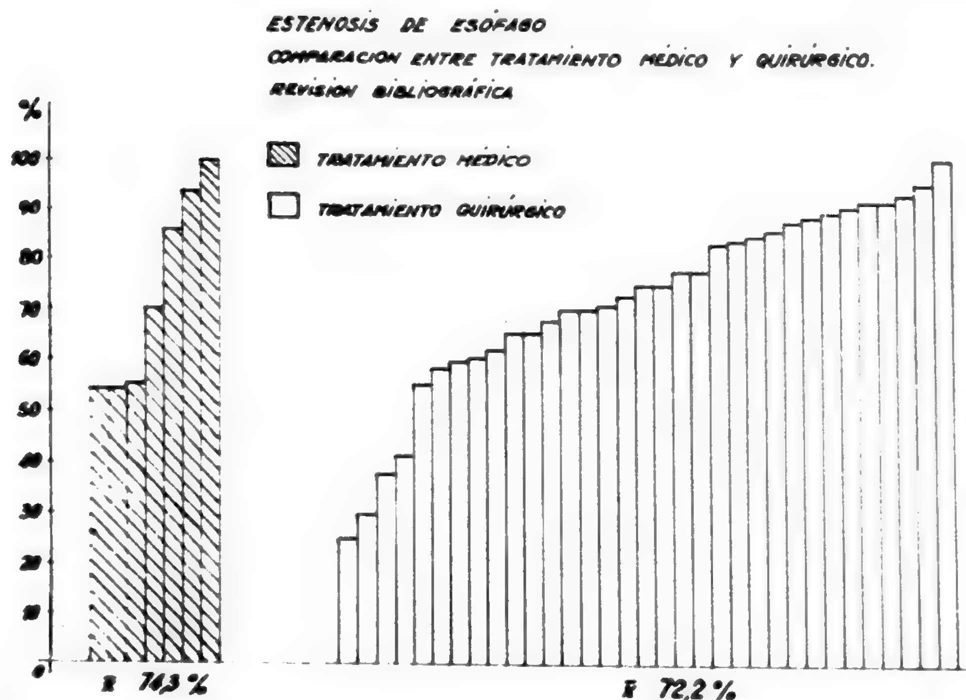


Fig. 5. — Comparación de resultados entre tratamiento médico y quirúrgico, revisión bibliográfica.

[43, 46, 63, 64, 70, 75, 78-80, 86-88, 96, 99, 107, 109, 110, 115, 122], cifras del 25 % al 100 % ($\bar{x}$ 72.2 %). La morbilidad por dilatación (Fig. 6) [13, 28, 62, 69, 91, 94, 98, 102, 122], fue de 0 % al 77.7 % ($\bar{x}$ 10.5 %) y por cirugía [33, 78, 86, 88, 109], de 2 % al 63.1 % ($\bar{x}$ 15.3 %). La mortalidad por dilataciones (Fig. 7) [13, 94, 102, 122], fue del 0 % al 12 % ($\bar{x}$ 5.1 %), mientras que fue del 0 % al 50 % ($\bar{x}$ 12.3 %) por cirugía [7, 12, 43, 46, 51, 64, 78-80, 88, 94, 99, 107, 109, 110, 122, 123].

Los datos recién expresados nos permiten sacar las siguientes conclusiones: 1) Los resultados de dilatación y cirugía en la estenosis benigna del esófago son similares, si bien ligeramente superiores en la dilatación, y 2) la morbimortalidad es marcadamente menor en la dilatación que en la cirugía. Es indudable que podemos resolver el problema de la estenosis del esófago por medio de la dilatación, pero debemos dejar claramente sentado el hecho de que con esto no termina la cuestión, dado que puede persistir la enfermedad reflujo que fuera causante de la es-

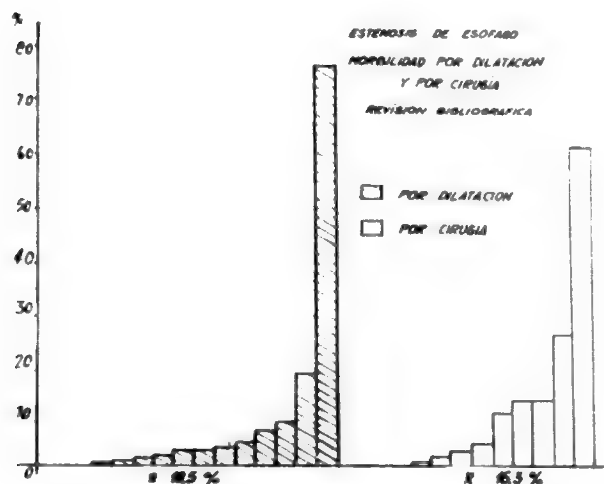


Fig. 6. — Comparación de morbilidad por dilatación y cirugía, revisión bibliográfica.

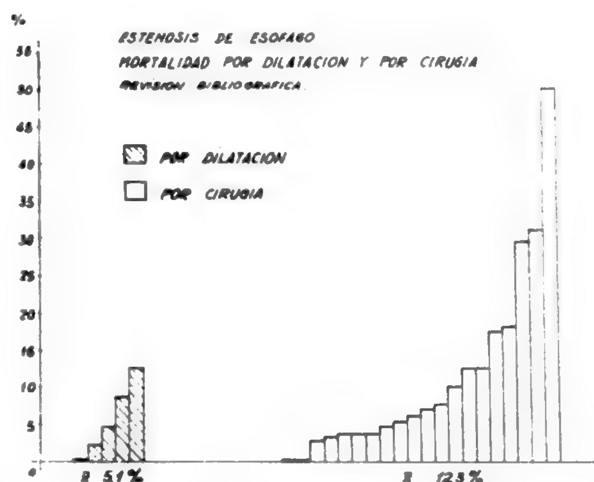


Fig. 7. — Comparación de mortalidad por dilatación y cirugía, revisión bibliográfica.

tenosis. Una vez finalizada la dilatación, se debe instituir un correcto tratamiento médico antirreflujo tal como delineamos en el capítulo de Material y métodos. De fallar el tratamiento médico, debemos entonces ofrecer al paciente un tratamiento quirúrgico que lo provea de un mecanismo antirreflujo adecuado. Este paso debe cumplirse previa dilatación de la estenosis, dado que junto con Palmer [82] y Pearson [87], estamos en desacuerdo con Larrain [68], quien cree que el simple tratamiento quirúrgico antirreflujo cura la estenosis.

Dijimos que los resultados del tratamiento dilatador y quirúrgico son similares. Destacamos, asimismo, el hecho de que la pluralidad de tratamientos propuestos no hace nada más que demostrar que ni las dilataciones ni la cirugía han provisto hasta el presente con la solución ideal para este difícil problema. Creemos que ésta reside en el estudio y tratamiento correcto de la enfermedad reflujo gastroesofágico, a fin de prevenir el desarrollo de complicaciones tales como la esofagitis por reflujo, la úlcera, o la estenosis de esófago. En este sentido, es promisorio el avance de la última década en el conocimiento de la fisiología del esófago, desde que Castell [21] describiera el efecto de la gastrina sobre el esfínter esofágico inferior. Desde entonces se ha estudiado la acción de varias hormonas digestivas, como así de diversos péptidos [24, 29, 31, 74, 76, 95, 103, 120] que, aparentemente, regulan el funcionamiento de este delicado complejo neuromuscular que constituye el esófago.

Por último, es de destacar otro hecho promisorio que quizás nos permita intentar el tratamiento químico de la estenosis benigna del esófago, tal es la posibilidad del uso de diferentes drogas con capacidad para disminuir la fibrogénesis [26, 40, 58, 61].

Resumen

En el presente trabajo hemos analizado los resultados de una década de experiencia con un nuevo método de dilatación prolongada en las estenosis benignas del esófago. Los pacientes fueron estudiados por medio de radiología, esofagoscopía, biopsia, citología exfoliativa, electromanometría, acidimetría gástrica, determinación de reflujo por pH-metría, y depuración esofágica de ácido clorhídrico. Se dilataron 49 pacientes, 77.5 % hombres y 22.4 % mujeres. La relación hombre/mujer fue 3.4 : 1 y la edad promedio 59.4 ± 15.1 años La esofagitis por reflujo fue la etiología predominante de la estenosis (77.5 %), y la hernia hiatal por deslizamiento la patología asociada más frecuente (87.3 %). La electromanometría constituyó un elemento diagnóstico de importancia para determinar la causal del reflujo gastroesofágico (EEI hipotenso), mientras que el método más fidedigno para determinar el calibre de la estenosis esofágica fue el denominado por nosotros "calibración". Los resultados obtenidos con este sistema de dilatación fueron: excelentes en 87.7 %; buenos en 8.1 %, y malos en 4 % de los casos. La morbilidad fue 6.1 %, y la mortalidad 2 %. El seguimiento fue de un promedio de 27.3 meses. Consideramos que este método de dilatación es el de elección para la estenosis secundaria a esofagitis por reflujo. En general los resultados de las dilataciones de esófago son similares (si bien ligeramente superiores) a los de la cirugía, pero la morbimortalidad es marcadamente menor en la dilatación que en la cirugía. En caso de recidivar la estenosis (pese a la administración de tratamiento médico antirreflujo), debemos ceder paso al tratamiento quirúrgico.

Summary

TREATMENT OF BENIGN ESOPHAGEAL STENOSIS BY SLOW CONTINUOUS DILATATION.

In 1972, we described a new method for the dilatation of benign esophageal stenosis. The purpose of this paper is to report the results obtained with this method in 49 patients during the 1970-1979 decade. The mean age of the group was 59.4 ± 15.1 years, and the male-female ratio was 3.4 : 1 (Fig. 1). The patients were studied by means of X-Rays, "calibration" of the stenosis, endoscopy, biopsy, cyto-

logy, gastric secretion, pH reflux test, and esophageal motility. Biopsy and cytology confirmed the endoscopic diagnosis of esophagitis and/or benign stenosis in 100 % of the cases. The gastric secretion pattern showed 40.9 % of hypersecretion, and pH reflux test were positive in 100 % of the studies performed. The mean lower esophageal sphincter pressure in our normals was 14.8 ± 2.5 mm Hg, and 4.8 ± 5.2 mm Hg in the stenosis group (Fig. 3). The pretreatment diameter of the stenosis as determined by X-Rays was 6.5 ± 3.8 mm, and the diameter determined by "calibration" 8.8 ± 3.8 mm (Fig. 2). The treatment by progressive dilatation lasted an average of 16.1 days. After the dilatation, the X-Ray diameter was 13.9 ± 2.8 mm and the "calibration" diameter 14.9 ± 2.3 mm. The difference according to statistical analysis was significative. The results were as follows: excellent in 43 patients (87.7 %), good in 4 patients (8.2 %), and poor in 2 patients (4.1 %). The morbidity of the treatment was 6.1 %, and the mortality 2 % (Fig. 4). The follow-up averaged 27.3 months. We believe that this method of dilatation is the elective one for the stenosis secondary to reflux esophagitis. In general, the results of dilatations are similar (although slightly superior) to those of surgery, but the morbi-mortality is markedly lower (Figs. 5, 6, 7).

Agradecimiento: Los autores agradecen a la Lic. Mirta M. de Cardini por el análisis estadístico.

Bibliografía

1. Aprigliano F, Paulino F: Management of reflux esophagitis stenosis. *J Fr Otorhinolaryng* 23 (8): 725, 1974.
2. Auguste G: Traitement des stenoses benignes de l'oesophage par la dilatation. *Acta Gastroent Belg* 25: 906, 1962.
3. Banfield WJ, Hurwitz AL: Esophageal stricture associated with nasogastric intubation. *Arch Int Med* 134 (6): 1083, 1974.
4. Barrett NR: Benign stricture of the lower esophagus. *J Thorac Cardiov Surg* 43: 703, 1962.
5. Barrett NR: Chronic peptic ulcer of the oesophagus and "oesophagitis". *Br J Surg* 38: 175, 1950.
6. Belsey RHR: Oesophageal obstruction in childhood. *Gastroenterologia (Basel)* 86: 301, 1956.
7. Benedict EB: Peptic stenosis of the esophagus. A study of 233 patients treated with bougienage, surgery, or both. *Am J Dig Dis* 11: 761, 1966.
8. Benedict EB: Benign stenoses of the esophagus. *Am J Dig Dis* 6: 570, 1961.
9. Benedict EB, Gillespie JEO: Peptic stenosis of the esophagus. *Surg Gynec Obst* 98: 494, 1954.
10. Bennett JR: A safer method of dilating benign esophageal strictures. *Gut* 13: 1026, 1972.
11. Bennett JR: Esophageal strictures. *Clin Gastroenterol* 7: 555, 1978.
12. Bergh NP, Gatzinsky P, Sandberg N: Pathophysiology and treatment of benign stricture of the esophagus. *J Fr Otorhinolaryngol* 23 (8): 725, 1974.
13. Bill AH, Mebust WK, Sauvage LR: Evaluation of techniques of esophageal dilatation in relation to the danger of perforation. A study of 411 dilatations of benign stricture in children. *J Thorac Cardiov Surg* 45: 510, 1963.
14. Booth DJ, Kemmerer WT, Skinner DB: Acid clearing from the distal esophagus. *Arch Surg* 96: 731, 1968.
15. Brindley GV Jr, Wangsamutr L: Surgical treatment of strictures of the esophagus associated with hiatal hernia. *Ann Surg* 173: 649, 1971.
16. Burkhart KL, Sullivan BH Jr: Course and treatment of benign esophageal strictures. *Am J Gastroenterol* 58: 531, 1972.
17. Burnett H, Read R, Morrisow D, Campbell S: Management of complications of fundoplication and Barrett's esophagus. *Surgery* 82: 521, 1977.
18. Cameron A, Payne WS: Barrett's esophagus occurring as a complication of sclerodermia. *Mayo Clin Proc* 53: 612, 1978.
19. Carter D, Osborne D, Lennon J: Effect of cimetidine on lower oesophageal sphincter pressure. 2nd. Int. Sympos. on H2 receptor antagonists. *Excerpta* Med 135, 1977.
20. Carter D, Osborne D, Lennon J: Cimetidine in the treatment of oesophagitis. 2nd. Int. Sympos. on H2 receptor antagonists. *Excerpta Med* 297, 1977.
21. Castell DO, Harris LD: Hormonal control of gastroesophageal sphincter. *N Engl J Med* 282: 886, 1970.
22. Clark J, Moosa AR, Skinner DB: Pitfalls in the performance and interpretation of esophageal function tests. *Surg Clin North America* 56: 29, 1976.
23. Code C, Creamer B, Schlegel J, Olsen A, Donoghue F, Andersen H: An atlas of esophageal motility in health and disease. Charles Thomas, Springfield, Illinois, USA, 1958, p. 1.
24. Cohen S, Lipshutz W: Hormonal regulation of human lower esophageal sphincter competence: interaction of gastrin and secretin. *J Clin Invest* 50: 449, 1971.
25. Csendes A, Larrain A, Uribe P: Gastric acid secretion in patients with a symptomatic gastroesophageal reflux and patients

with esophageal strictures. *Ann Surg* 176: 119, 1974.
26. Davis WM, Madden JW, Peakock EC Jr: A new approach to the control of esophageal stenosis. *Ann Surg* 176: 469, 1972.
27. De Meester T, Johnson LF: The evaluation of objective measurements of gastroesophageal reflux and their contribution to the patient management. *Surg Clin North America* 56: 39, 1976.
28. Didcott CC: Oesophageal strictures. Treatment by slow continuous dilatation. *Ann R Coll Surg Engl* 53: 112, 1973.
29. Dilawari JB, Newman A, Poleo J, Misiewicz H: The effect of prostaglandins and antiinflammatory drugs on the lower esophageal sphincter in man. Actas V Congreso Mundial de Gastroenterología, p 171, 1974.
30. Dimarino AJ, Rosato E, Rosato F, Cohen S: Improvement in lower esophageal sphincter pressure following surgery for complicated gastroesophageal reflux. *Ann Surg* 177: 239, 1975.
31. Domschke W, Lux G, Domschke S, Strunz U, Bloom SR, Wünsch E: Effects of vasoactive intestinal peptide on resting and pentagastrin stimulated lower esophageal sphincter pressure. *Gastroenterology* 75: 9, 1978.
32. Ellis FH Jr: Experimental aspects of surgical treatment of reflux esophagitis and esophageal stricture. *Ann Surg* 143: 465, 1956.
33. Ellis H, El-Kurd MF, Gibb PS: The effect of fundoplication on the lower esophageal phincter. *Surg Gynec Obstet* 143: 1, 1976.
34. Ellis FH, Leonardi HK, Dabusksky L, Lozier RE: Surgery for short esophagus with stricture. *Ann Surg* 188: 341, 1978.
35. Emerson EB Jr: Modification of Teflon esophageal dilators for blind dilatation over a string. *J Thorac Cardiovasc Surg* 62: 248, 1971.
36. Emerson EB Jr: Teflon esophageal dilators. *Arch Otolaryng (Chicago)* 81: 213, 1965.
37. Emerson JB Jr: Teflon esophageal dilators for children. *J Thorac Cardiov Surg* 52: 579, 1966.
38. Fisher RS, Malmud LS, Lobis IF, Maier WP: Antireflux surgery for symptomatic gastroesophageal reflux. Mechanism of action. *Digestive Diseases* 23: 152, 1978.
39. Gaillard J, Haguenauer JP, Dumolard P, Maitrejean Y: Le syndrome peptique de l'oesophage a expression stenosante. *J Fr Otorhinolaryngol* 24 (1) 43, 1975.
40. Gaillard J, Haguenauer JP, Gignoux B: Injections in situ de corticoide-retard dans certaines stenoses cicatricielles de l'oesophage. *J Fr Otorhinolaryngol* 24 (5): 399, 1975.
41. Glasgow JC, Cannon JP, Elkins RC: Colon interposition for benign esophageal disease. *Am J Surg* 137: 175, 1979.
42. Halabi M. Martini RB, Ferreras HB, Aguirre C: Esofagitis péptica estenosante. *Prensa Méd Argent* 58: 1894, 1971.
43. Harrison GK, Gompels BM: Treatment of strictures of the oesophagus by the Nissen-Rossetti operation. *Thorax* 26: 77, 1971.
44. Hayward J: The treatment of fibrous stricture of the oesophagus associated with hiatal hernia. *Thorax* 16: 45, 1961.
45. Hendren WH, Hale JL: Electromagnetic bougienage to lengthen esophageal segments in congenital esophageal atresia. *N Engl J Med* 29: 428, 1975.
46. Hill LD, Gelfand M, Bauermeister D: Simplified management of reflux esophagitis with stricture. *Ann Surg* 172: 638, 1970.
47. Hill M, Knauer CM: The management of symptomatic Schatzki ring. *Gastroint End* 21: 116, 1975.
48. Hishons S, Lovell D, Gummer JWP, Smithies A, Shawdon H, Blendis LN: Cytology in the diagnosis of esophageal cancer. *Lancet* 1: 296, 1976.
49. Hoag L: Nouvelle méthode de dilatation graduelle des stenoses benignes de l'oesophage. *Ann d'oto-laryngol* 184, 1938.
50. Holden MP, Wooler GH: Mousseau-Barbin tubes for benign stricture of the esophagus. *Thorax* 26: 619, 1971.
51. Holt C, Large A: Surgical management of reflux esophagitis. *Ann Surg* 153: 555, 1961.
52. Imre J, Kopp M: Argument against long-term conservative treatment of oesophageal strictures due to corrosive burns. *Thorax* 27: 594, 1972.
53. Ismail-Beigi F, Horton P, Pope C: Histological consequences of gastroesophageal reflux in man. *Gastroenterology* 58: 163, 1970.
54. Ismail-Beigi F, Pope C: Distribution of histological changes of gastroesophageal reflux in the distal esophagus of man. *Gastroenterology* 66: 1109, 1974 .
55. Johnson RB, Lukash WM: Dilatación de las estrecheces esofágicas. *Trat Mod* Nov-Dic 121, 1970.
56. Johnston JA: Gastric lined esophagus associated with rings and stenosis. *Ann Surg* 173: 641, 1971.
57. Kay AW: Gastric analysis. *Br Med J* 2: 77, 1953.
58. Kershenobich D, Uribe M, Suárez G, Mata J, Pérez-Tamayo R, Rojkind M: Treatment of cirrhosis with colchicine. *Gastroenterology* 77:. 532, 1979.
59. Knudsen DF, Oberhelman HA: A new bougie. *Am J Surg* 120: 420, 1970.
60. Kobayashi S, Kasugai T: Endoscopic and biopsy criteria for the diagnosis of esophagitis with fiber optic esophagoscope. *Digestice Diseases* 19: 345, 1974.
61. Lanari A, Molinas F, Castro Ríos M, Paz R: Eficaz tratamiento de diversas fibromatosis con progesterona. Mediastinitis fibresa, tumores desmoides, fibrosis paraneoplásica. *Medicina (Bs Aires)* 38: 123, 1978.
62. Lanza FL, Graham DJ: Bougienage is effective therapy for most benign esophageal strictures. *JAMA* 240: 844, 1978.
63. Larrain A, Csendes A, Pope CE: Surgical

correction of reflux. An effective therapy for esophageal strictures. *Gastroenterology* 69: 578, 1975.

64. Larrain A, Csendes A, Strauzer J: Bases fisiopatológicas del tratamiento quirúrgico de las estenosis esofágicas por reflujo. *Rev Med Chile* 99: 823, 1971.
65. Lazaroni FA, Chiocca JC, Salis GB, Mazure PA: Acción del bromuro de metoclopramida y del clorhidrato de metoclopramida sobre el esfínter esofágico inferior y la peristalsis del tercio inferior del esófago. *Acta Gastroent Lat Amer* 9: 15, 1979
66. Lilly JO, Mc Caffery D Jr: Esophageal stricture dilatation. A new method adapted to the fiberoptic esophagoscope. *Am J Dig Dis* 16: 1137, 1971.
67. Linscheer WG: Severance of esophageal web by balloon catheter. *Lancet* 2: 1288, 1970.
68. Lobello R: Lower esophageal sphincter tone in patients with peptic stricture. *Thorax* 33: 574, 1978.
69. Martini RB, Ferreras HB, Halabi M: La dilatación "circular" en el tratamiento de la estenosis benigna del esófago. *Rev Fac Cienc Méd Córdoba* 34: 29, 1976.
70. May IA, Byrne WD, Jee J, Hardy KL, Samson PC: Left colon bypass for benign and malignant disease of the esophagus. *Am J Surg* 108: 204, 1964.
71. Mazure PA, Schraier M, Garrido A: Estudio de la concentración y débito de la acidez clorhídrica en la secreción gástrica humana. *Arch Arg Enf Ap Dig* 37: 3, 1962.
72. Mazure PA, Sferco A, Chiocca JC: Efecto de los alginatos sobre el reflujo gastroesofágico de las hernias hiatales. *Acta Gastroent Lat Amer* 6: 71, 1974.
73. Mazure PA, Chiocca JC, Sferco A: New device for progressive dilatation of benign oesophageal stricture. *GUT* 12: 153, 1972.
74. Meissner SJ, Bowes KL, Zwick R, Daniel E: Effect of motilin on the lower oesophageal sphincter. *GUT* 17: 925, 1976.
75. Moylan JP, Bell JW, Cantrell JR, Merendino KA: The jejunal interposition operation: A follow-up on seventeen patients followed 10 to 17 years. *Ann Surg* 172: 205, 1970.
76. Mukhopadhyay AK: Effect of substance P on the lower esophageal sphincter of the opossum. *Gastroenterology* 75: 278, 1978.
77. Naef AP, Savary AM, Ozello L: Columnar lined lower esophagus: An acquired lesion with malignant predisposition. *J Thorac Cardiov Surg* 70: 826, 1975.
78. Nicks R: Restoration of the strictured gullet. *Thorax* 28: 498, 1973.
79. Olaciregui JC: Tratamiento quirúrgico de las esofagopatías benignas. *Revista Argentina de Cirugía,* Número Extraordinario, p. 52, 1972.
80. Orringer M, Sloan H: Collis Belsey reconstruction of the esophagogastric function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 71: 295, 1976.
81. Pagliero KM: Facilitating esophageal bouginage. *Lancet* 1: 467, 1973.
82. Palmer ED: The hiatus hernia-esophagitis-esophageal stricture complex. Twenty year prospective study. *Am J Med* 44: 566, 1968.
83. Palmer ED: Subacute erosive esophagitis, clinical study. *Arch Int Med* 94: 364, 1954.
84. Paulson DL: Benign stricture of the esophagus secondary to gastroesophageal reflux. *Ann Surg* 165: 765, 1967.
85. Payne JH: Smith WR, Berne DJ: The problem of advanced acid peptic esophagitis. *Am J Gastroenterol* 22: 108, 1954.
86. Payne S: Surgical treatment of reflux esophagitis and stricture associated with permanent incompetence of the cardia. *Mayo Clin Proc* 45: 555, 1970.
87. Pearson FG, Henderson RD: Long term follow-up of peptic strictures managed by dilatation and modified Collis gastroplaty and Belsey hiatus hernia repair. *Surgery* 80: 396, 1976.
88. Pearson FG, Henderson RD: Experimental and clinical studies of gastroplasty in the management of acquired short esophagus. *Surg Gynec Obstet* 136: 737, 1973.
89. Pope C: Effect of infusion on force closure measurements in the human esophagus. *Gastroenterology* 58: 616, 1970.
90. Pope C: A dynamic test of sphincter strength: its application to the lower esophageal sphincter. *Gastroenterology* 52, 779, 1967.
91. Price JD, Stanciu C, Bennett JR: A safer method of dilating oesophageal strictures. *Lancet* 1: 1141, 1974.
92. Pridie RB: Incidence and coincidence of hiatus hernia. *GUT* 7: 188, 1966.
93. Puestow KL: Conservative management of occlusive diseases of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 24: 224, 1955.
94. Raptis S, Milne DM: A review of the management of 100 cases of benign stricture of the oesophagus. *Thorax* 27: 599, 1972.
95. Rattan S, Said SI, Goyal RK: Effect of vasoactive intestinal peptide on the lower esophageal sphincter pressure. *Proc Soc Exp Biol Med* 155: 40, 1977.
96. Rayl JL, Balison JL: Management of longitudinal stricture resulting from reflux esophagitis. *Ann Thorac Surg* 15: 439, 1973.
97. Rodríguez-Adrados F: Rapid dilatation of esophageal and laryngo-tracheal stenosis by laminaria tents. *J Fr Otorhinolaryngol* 23: 760, 1974.
98. Royston CMS, Dowling BL, Gear MJ: Procceedings: Oesophageal dilatation using the Eder-Puestow dilators. *GUT* 16: 411, 1975.
99. Royston CMS, Dowling BL, Spencer J: Antrectomy with Roux-en-Y anastomosis in the treatment of peptic oesophagitis with stricture. *Br J Surg* 62: 605, 1975.
100. Seefeld GJ: Esophageal histology in esophagitis. *Am J Dig Dis* 22: 960, 1977.
101. Sferco A, Chiocca JC, Mazure PA: Nuestra experiencia clínica en motilidad esofá-

gica. *La Semana Médica* Edición 78º Aniversario, p 144, 1972.
102. Silvis S, Nebel O, Rogers G, Sugawa C, Mandelstam P: Endoscopic complications. Results of the 1974 American Society for Gastrointestinal Endoscopy Survey. *JAMA* 235, 928, 1976.
103. Sinar DR, O'Dorisio TM, Mazzaferri ER, Makhjian HS, Caldwell JH, Thomas FB: Effect of gastric inhibitory polypeptide on lower esophageal sphincter pressure in cats. *Gastroenterology* 75: 263, 1978.
104. Snedecor GW, Cochran WC: Statistical methods. 6th. Ed. Ames Iowa State University Press, 1967, p 68.
105. Stein GN, Finkelstein A: Hiatal hernia: roentgen incidence and diagnosis. *Am J Dig Dis* 5: 77, 1960.
106. Stef J, Dodds W, Hogan W: Intraluminal esophageal manometry: an analysis of variables affecting recording fidelity of peristaltic pressures. *Gastroenterology* 67: 22, 1974.
107. Stell PM: Benign strictures of the cervical esophagus. *Thorax* 28: 254, 1973.
108. Stol DW, Murphy GM, Leigh Collis E: Duodeno gastric reflux and acid secretion in patients with symptomatic hiatal hernia. *Scand J Gastroent* 9: 97, 1974.
109. Strug B, Jordan P, Jordan J: Surgical management of benign esophageal strictures. *Surg Gynec Obstet* 138: 74, 1974.
110. Tanner NC, Westerholm P: Partial gastrectomy in the treatment of esophageal stricture after hiatal hernia. *Am J Surg* 115: 449, 1968.
111. Terracol J, Sweet RH: Enfermedades del esófago. Librería y Editorial Bernardes SRL. Buenos Aires, 1961, p 409.
112. Terracol J, Sweet RH: Enfermedades del esófago. Librería y Editorial Bernardes SRL. Buenos Aires, 1961, p 422.
113. Terracol J, Sweet RH: Enfermedades del esófago. Librería y Editorial Bernardes SRL. Buenos Aires, 1961, p 427.
114. Terracol J, Sweet RH: Enfermedades del esófago. Librería y Editorial Bernardes SRL. Buenos Aires, 1961, p 130.
115. Thomas HF, Clarke JM, Rayl JE, Woodward RL: Results of the combined fundic patch-fundoplication in the treatment of reflux esophagitis with stricture. *Surg Gynec Obstet* 135: 241, 1972.
116. Thompson TH: Disorders of oesophageal motility. *Clin Gastroent* 5: 152, 1980.
117. Tucker G, Lantz V, Tracy JB, Fearon BW: Diagnosis and treatment of benign stenosis with special reference to treatment by dilatation with the indwelling cannulated bougie. *Ann Otol Rhin & Laryng* 59: 823, 1950.
118. Tucker G, Hawthorne HR: Follow-up observations on treatment of benign stenosis; of treatment with cannulated bougie; surgical treatment. *Ann Otol Rhin & Laryng* 60: 731, 1951.
119. Tuttle SG, Grossman MI: Detection of gastroesophageal reflux by simultaneous measurement of intraluminal pressures and pH. *Proc Soc Exp Biol Med* 98: 225, 1958.
120. Uddman R, Alumets J, Edvinsson L, Hakanson R, Sundler F: Peptidergic (VIP) innervation of the esophagus. *Gastroenterology* 75: 5, 1978.
121. Vilardell F: Exfoliative cytology of the esophagus. *In:* Bockus, H. L.: Gastroenterology Vol. I, Chapter IX, W. B. Saunders Co., Philadelphia & London, 1963, p 141.
122. Williamson RCN: The management of peptic oesophageal stricture. *Br J Surg* 62: 448, 1975.
123. Yanopoulos P, Marselo A: Total bypass of the oesophagus for benign strictures using a reversed gastric tube. *Thorax* 32: 729, 1977.

— — — —

Les hommes sont si nécessairement fous, que ce serait être fou par un autre tour de folie, de n'être pas fou.

Los hombres son locos necesariamente, de modo que el no serlo sería indicio de una locura de otro género.

BLAISE PASCAL (1623-1662)
Pensées

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 287-292 (1981)

ALTERACIONES INMUNOLOGICAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE HODGKIN EN REMISION Y EN RECAIDA CLINICA

BEATRIZ RUIBAL ARES *. MARIA DEL CARMEN SASIAIN *, DORA MARIA BREZAVSCEK **, MARCELA FEJES *, A. E. BACHMANN *

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Son numerosos los trabajos que se han realizado sobre la exploración inmunológico de pacientes con enfermedad de Hodgkin y linfomas no Hodgkin. Recientemente Case [2] y Jones [8], han publicado estudios que son verdaderas actualizaciones sobre el tema. Sin embargo, del análisis de estos y de otros trabajos surge una gran disparidad de datos según los distintos parámetros utilizados en los estudios inmunológicos, tanto in vivo como in vitro [3, 4, 7, 8, 13, 17]. También difiere la forma de agrupar a los enfermos según el estadío clínico, el tipo histológico, el tratamiento, la edad, etc. [2, 4, 8, 17]. En un trabajo nuestro publicado recientemente [13], se comprobó que los enfermos con enfermedad de Hodgkin (EH) *** en recaída clínica, presentaban alteraciones manifiestas de las reacciones de la inmunidad mediada por células tanto in vivo, como in vitro. Las reacciones cutáneas a la PPD, el número de linfocitos T y la respuesta de los mismos a la fitohemaglutinina (PHA), estaban acentuadamente disminuidas en estos pacientes en comparación con aquellos en remisión y con un grupo de testigos normales. En el presente trabajo se agregaron nuevos parámetros de inmunidad humoral y celular a un mayor número de pacientes con EH, en recaída y en remisión clínica, y se valoraron simultáneamente con las pruebas inmunológicas de rutina. Se estudió el título de anticuerpos anti-virus de Epstein Barr (VEB) y se realizaron cultivos mixtos unidireccionales usando una línea celular linfoblastoide. Se comprobó la alteración en todas estas reacciones en los EH en recaída, al ser comparados con los mismos pacientes sin sintomatología y con testigos normales.

Material y métodos

Pacientes: Se estudiaron 35 enfermos con Hodgkin cuyas edades oscilaban entre los 12 y 77 años. Se agruparon según la presencia o au-

Recibido: 15-X-1980. Aceptado: 18-III-1981.

* Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Miembro de la Carrera del Técnico, CONICET.

Dirección postal: Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Las Heras 3092, 1425 Buenos Aires, Argentina.

*** *Abreviaturas:* EH, Enfermedad de Hodgkin; PPD, Prueba cutánea con *purified protein derivative*; PHA, Fitohemaglutinina; VEB, Virus de Epstein Barr; VCA, *Viral capsid antigen*; EB NA, *Epstein Barr nuclear antigen*; MIE, Microinmunoelectroforesis; MLC, Cultivo mixto de linfocitos unidireccional; I.E., Indice de estimulación; EAC, Rosetas dependientes del C 3; E, Rosetas espontáneas.

sencia de sintomatología en el momento del estudio: 14 con sintomatología clínica y 21 en remisión. Los pacientes con recaída tenían entre 76 y 19 años, con un promedio de 40.3 años. La mitad estaba constituida por mujeres. Las formas anatomopatológicas fueron: predominio linfocítico 1, escleronodular 6, celularidad mixta 6 y depleción linfocitaria 1 [9]. Los enfermos en remisión tenían edades entre los 77 y 12 años, con un promedio de 44.2. De ellos 6 era mujeres y 15 hombres. Las formas anatomopatológicas de estos 21 pacientes fueron: predominio linfocítico 2, forma escleronodular 3 y celularidad mixta 16. Los enfermos habían suspendido la medicación un mes o más antes del estudio. Ninguno de ellos estaba esplenectomizado.

Proteinogramas: Se efectuó corrida electroforética de los sueros en cellogel, determinándose el nivel de proteínas posteriormente por densitometría.

Microinmunoelectroforesis (MIE): Se realizaron MIE de las proteínas séricas, enfrentándolas con antisueros de conejos antiproteínas humanas totales, anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA (Behring), según el procedimiento de Scheidegger [15].

Preparación de linfocitos: Se extrajeron 20 ml de sangre venosa y los linfocitos se purificaron por medio de un gradiente de Ficoll-Hypaque, siguiendo el método de Thornsby [16].

Determinación de rosetas EAC: Se incubaron linfocitos con eritrocitos de carnero con hemolisina de conejo y complemento de ratón, según el método de Bianco y colaboradores [1].

Determinación de rosetas E: Se incubaron linfocitos con glóbulos rojos de carnero al 1 % durante 15 minutos a 37° C. Se leyeron las rosetas luego de permanecer 18 h a 4° C.

Determinación de anticuerpos anti-VEB: a) anti-VCA: se usaron células HR1K fijadas en acetona y se procedió de acuerdo a la técnica de Henle [5]; *b) anti-EBNA:* se utilizó el procedimiento descripto por Reedman [11] con células RAJI fijadas con metanol acetona, detectando inmunofluorescencia anticomplementaria en 3 pasos. Como sueros positivos se usaron Masongo, RK001 y TU-65. Como sueros negativos se usaron EM, EK y RK003. Se testaron sueros de 40 dadores normales del Instituto. Una vez separado, el suero fue conservado a $-20°$ C con azida sódica. Igual procedimiento se siguió con los sueros de los enfermos de Hodgkin.

Cultivo de linfocitos con PHA: Los linfocitos fueron resuspendidos a una concentración de 1×10^6 células/ml en RPMI 1640 suplementado con suero humano AB Rh^+, anfotericina B al 1 % y gentamicina 50 μg/ml. Se realizaron cultivos controles y estimulados con PHA-P (Difco) a 37° C durante 72 h. Previo pulso de ^{3}HTdr (1 μCi a.e. 20 Ci/mmol) (N.E.N.) de 3 h, se contó la fracción tricloroacética precipitable en un contador de centelleo líquido (Packard).

$$\text{I.E.} = \frac{\text{cpm estimulados}}{\text{cpm control}}$$

Cultivo mixto unidireccional (MLC): Con algunas variantes se siguió la técnica de Royston [12]. Se usaron células HR1K [6] (5×10^6 células/ml), previo tratamiento con mitomicina C (50 μg/ml) durante 45 min a 37° C. Luego de lavarse, se resuspendieron en medio de cultivo a una concentración de 2×10^6 células vivas/ml. Se incubaron en presencia de linfocitos en una relación 1:25 durante 7 días a 37° C. Se valoraron los cultivos mediante incorporación de ^{3}HTdr durante 24 h y se procesaron como en el punto anterior. Paralelamente se realizaron cultivos controles de las células inactivadas y de linfocitos no estimulados. Los resultados se expresaron como índice de estimulación (I.E.):

$$\text{I.E.} = \frac{\text{cmp estimulado-cmp HR1K inactivadas}}{\text{cmp linfocitos control}}$$

Pruebas cutáneas: Se usó PPD (2UT) preparado en el Centro Panamericano de Zoonosis y cedido gentilmente por la Dra. I. Kantor. La lectura se efectuó a las 72 h, considerándose positivas las reacciones iguales o superiores a los 6 mm.

Valoración estadística: Se aplicaron los métodos de X^2 y el t de Student.

Resultados

Proteinogramas y microinmunoelectroforesis: El promedio de las proteínas totales de los enfermos con Hodgkin fue de 6.78 g% con una gammaglobulina de 1.38 g%. Los enfermos en remisión presentaron un valor medio de proteínas de 6.88 g% y 1.41 g% para la gammaglobulina.

En el análisis microinmunoelectroforético se constató en 10 enfermos de EH en recaída (71.43 %) diversas alteraciones del trazado, a saber: IgM, 3 aumentadas, 2 disminuidas y 2 negativas; IgA, 1 negativa; IgG, 1 disminuida y una proteína C reactiva. Casi todas las alteraciones corresponden a los casos con celularidad mixta. Un paciente con predominio linfocítico presentó aumento de la IgM y otro con forma escleronodular, una proteína C reactiva. De los 21 pacientes en remisión se observó en 3 de ellos aumento de la IgM y en 5 una disminución de la misma fracción (38.1 % de enfermos con alteraciones en el trazado). De los 8 pacientes con alteraciones, 7 eran del tipo celulari-

TABLA 1. — *Inmunidad humoral en pacientes con enfermedad de Hodgkin*

Grupo	n	Proteínas totales g %	Gamma globulinas g %	Alteraciones en MIE %	Nº de linfocitos B por EAC	VCA 1/título	EBNA 1/título
Normales	20	7.10 ± 0.50	0.9-1.3	0	574 ± 242	44.0 ± 3.6	36.2 ± 3.8
Hodgkin total	35	6.78 ± 0.55	1.38	45.31	412 ± 251 **a**	64.3 ± 6.1 **c**	42.3 ± 3.7
Hodgkin en remisión	21	6.88 ± 0.40	1.41	38.10	382 ± 180 **b**	55.6 ± 2.3 **b**	30.7 ± 6.1 **e**
Hodgkin en recaída	14	6.61 ± 0.72	1.31	57.14	483 ± 330	79.9 ± 2.9 **d**	65.6 ± 1.5 **f**

Comparación entre pacientes y normales: **a** $p < 0.02$; **b** $p < 0.005$; **c** $p < 0.05$; **d** $p < 0.0005$; **e** $p < 0.01$; **f** $p < 0.0005$ comparando los pacientes en recaída con aquellos en remisión.

dad mixta y 1 escleronodular que fue uno de los que presentaron aumento de IgM.

Rosetas EAC: El número de rosetas dependientes de la fracción C3 del complemento (EAC) del total de EH, fue significativamente menor que los normales ($p < 0.02$). Agrupando a los enfermos de acuerdo a su sintomatología, sólo aquellos en remisión presentaron una disminución significativa de EAC ($p < 0.005$) (Tabla 1).

Anticuerpos anti-VEB: Los resultados de investigar el título de anticuerpos anti-VCA y anti-EBNA en los pacientes y en los normales pueden verse en la Tabla 1. La comparación del título de anti-VCA entre ellos estuvo en el límite de la significancia. Sin embargo, al agruparlos nuevamente de acuerdo a la presencia de síntomas clínicos o no, se observó una diferencia altamente significativa entre normales y pacientes en recaída clínica ($p < 0.0005$). El título de anticuerpos anti-EBNA de los pacientes en recaída también fue significativamente mayor que los normales ($p < 0.01$). Al comparar los grupos en recaída y remisión se obtuvo una $p < 0.0005$.

Rosetas espontáneas (E): Se encontró una franca disminución del número de rosetas E al comparar la media del total de los pacientes con los valores normales ($p < 0.001$) (Tabla 2). Lo mismo se observó al dividir a los pacientes en recaída ($p < 0.001$) y en remisión clínica ($p < 0.005$).

Cultivos estimulados con PHA: Como se puede ver en la Tabla 2, la respuesta a la PHA de los enfermos en recaída fue menor que la de los individuos normales, sin llegar a diferencias significativas. Los enfermos en remisión se comportaron como los controles normales. Al comparar ambos grupos se obtuvo una $p < 0.001$.

Cultivo mixto unidireccional: Como puede verse en la Tabla 2, los valores medios del MLC fueron significativamente menores en los enfermos en recaída clínica comparados con el grupo control ($p < 0.005$). Los enfermos en remisión no presentaron diferencias medias respecto a los controles.

Pruebas cutáneas: La respuesta cutánea a la PPD fue negativa en todos los EH en recaída clínica. Al comparar con el grupo control se obtuvo una $p < 0.025$. No hubo diferencias al comparar al grupo en remisión con los controles.

Discusión

En este trabajo se agruparon los pacientes con enfermedad de Hodgkin según su sintomatología clínica, en el momento del estudio, valorándose la inmunidad mediada por células por medio de pruebas cutáneas, rosetas E, cultivo de linfocitos estimulados con PHA y MLC. El estudio de la inmunidad humoral se realizó por medio de proteinogramas, microinmunoelectroforesis, títulos de anticuerpos anti-virus de Epstein-Barr y rosetas EAC.

En un trabajo anterior[13] ya habíamos

TABLA 2. — *Inmunidad celular en pacientes con enfermedad de Hodgkin*

Grupo	n	Nº de linfocitos T por rosetas E	PHA I.E.	MLC I.E.	PPD Nº de positivos
Normales	20	1253.3 ± 575	54.9 ± 31.9	11.3 ± 8.8	18
Hodgkin totales	35	716.7 ± 340.5 **a**	61.9 ± 31.9	9.8 ± 9.1	12
Hodgkin en remisión	21	794.2 ± 371.1 **b**	75.8 ± 31.5	13.6 ± 12.5	12
Hodgkin en recaída	14	699.2 ± 355.1 **c**	41.1 ± 16.8 **f**	4.8 ± 2.8 **d**	0 **e**

Comparación entre pacientes y normales: **a** $p < 0.001$; **b** $p < 0.005$; **c** $p < 0.001$; **d** $p < 0.005$; **e** $p < 0.025$; **f** $p < 0.001$ comparando los pacientes en recaída con aquellos en remisión.

encontrado en un número menor de enfermos con linfoma Hodgkin, disminución en la respuesta a la PHA, a la intradermorreacción con PPD y alteraciones en el trazado de las inmunoglobulinas valoradas por microinmunoelectroforesis cualitativa. En esta nueva casuística, al agrupar los enfermos según su sintomatología clínica, se encontraron mayores alteraciones en el trazado de la microinmunoelectroforesis en el grupo de pacientes en recaída clínica (57 %). En estos mismos pacientes también se observó un aumento significativo en el título de anticuerpo anti-VEB, tanto para el VCA como EBNA, comparándolos con el grupo en remisión y los normales. El número absoluto de linfocitos formadores de rosetas EAC estaba disminuido en ambos grupos de enfermos, llamando la atención que la disminución fue mayor en la remisión clínica. El alto título de anticuerpos anti-VEB encontrado en los pacientes en recaída clínica podría deberse a una mayor susceptibilidad frente al virus, producida por la disminución en los mecanismos de defensa de estos enfermos. En este grupo se asociarían las alteraciones debidas al tratamiento con la recaída clínica, que se revertiría en parte durante la remisión, tal como se postuló en un trabajo anterior [10].

Con respecto a la inmunidad mediada por células, se encontró una franca disminución del número absoluto de linfocitos T en ambos grupos de pacientes. En cuanto a la respuesta de los linfocitos a la PHA, los datos de la literatura son muy contradictorios, porque mientras unos autores no encuentran una alteración manifiesta, otros señalan una franca disminución de la respuesta [2, 3, 17], sin que al parecer tenga relación la evolución o los tratamientos realizados [2, 7]. En otros estudios publicados se encuentran reacciones cutáneas normales y, sin embargo, respuesta a la PHA deficiente [2, 4, 17]. En nuestros pacientes, solamente en el grupo con sintomatología clínica se encontró una respuesta significativamente inferior al compararlos con los pacientes en remisión. Es de destacar que la respuesta a la PHA en nuestra casuística se encuentra normal o ligeramente aumentada en los pacientes en remisión. La disminución del grupo en recaída no llega a ser significativa con respecto a los normales.

Por otra parte, el MLC se realizó sobre una línea celular linfoblastoide HR1K derivada de un linfoma de Burkitt, siendo esta respuesta independiente de la función de los macrófagos [4]. Los datos obtenidos en el MLC se correlacionan con la intradermorreacción de Mantoux. Así, cuando las pruebas cutáneas son negativas, como ocurre en los enfermos en recaída de esta serie, el MLC arrojó bajos índices de estimulación. En cambio, en los pacientes en remisión se observaron pruebas cutáneas positivas e índices normales de estimulación en el MLC. Esto mismo fue observado por nosotros en los enfermos con linfoma no-Hodgkin [14] y por Graze y col. [4] en pacientes con Hodgkin. Esta correlación con la prueba cutánea no se observa con la transformación blástica a la PHA. Esto sería debido a que las subpoblaciones efectoras en el MLC y en el cultivo con PHA serían diferentes. Llaman la atención los altos títulos de anticuerpos anti-VEB observados en la recaída clínica y los bajos índices de estimulación en el MLC; estos resultados podrían deberse a una alteración en las

subpoblaciones T (helper o supresora) que impediría una adecuada regulación de los mecanismos que intervienen en estas pruebas.

Resulta evidente de los datos obtenidos que los pacientes en recaída clínica presentan alteraciones más severas, tanto en la inmunidad humoral como en la mediada por células. Para la inmunidad mediada por células esto se comprobó tanto en las pruebas cutáneas como en el MLC, mientras que para la humoral, en el número de linfocitos B y en el título de anticuerpo anti-VEB. Pensamos que el estudio de las subpoblaciones T helper y supresoras y del conocimiento de los mediadores solubles, permitirán circunscribir mejor las alteraciones inmunológicas de los pacientes con linfoma Hodgkin.

Resumen

Se valoran nuevos parámetros de inmunidad celular y humoral, además de los de rutina, en 35 pacientes con enfermedad de Hodgkin en remisión y en recaída clínica. Para la inmunidad mediada por células se usaron las siguientes técnicas: prueba cutánea (PPD), rosetas E, estimulación con PHA y cultivo mixto unidireccional (MLC) hacia una línea celular linfoblastoide (HR1K). Para la inmunidad humoral se efectuaron proteinogramas, microinmunoelectroforesis (MIE), rosetas EAC y dosaje del título de anticuerpos anti-virus de Epstein-Barr (anti-VCA y anti-EBNA). En los resultados se encontró una disminución significativa en el número absoluto de linfocitos T, tanto en los pacientes en remisión como en recaída; los pacientes en recaída mostraron disminución en la respuesta a la PHA, bajos índices de estimulación en el MLC y pruebas cutáneas negativas. Respecto a la inmunidad humoral, se encontraron alteraciones en el trazado de la MIE en 13 de los pacientes, disminución significativa en el número de rosetas EAC y aumento en el título de anticuerpos anti-VCA y anti-EBNA, especialmente en aquellos pacientes en recaída clínica. Resulta evidente que los pacientes en recaída clínica presentan alteraciones severas tanto en la inmunidad celular como en la humoral.

Summary

IMMUNOLOGICAL ALTERATIONS IN PATIENTS WITH HODGKIN DISEASE IN CLINICAL REMISSION AND RELAPSE.

Cellular and humoral immunity parameters were studied in 35 Hodgkin lymphoma patients in both clinical relapse and remission. To evaluate cellular immunity the following tests were performed: skin test (PPD), E rosettes, PHA stimulation and mixed lymphocyte cultures (M LC) against HR1K lymphoblastoid cell line. As for humoral immunity, proteinograms, microimmunoelectrophoresis (MIE), EAC rosettes and anti-Epstein-Barr virus antibody titers (anti-VCA and anti-EPNA) were determined. A significant decrease in the absolute number of T lymphocytes was found both in patients in relapse and in remission; patients in relapse showed low PHA response, low MLC values and negative skin tests. As for humoral immunity, alterations in the MIE were found in 13 patients; EAC rosettes were significantly diminished and high anti-EBV antibodies were found in all patients, specially during clinical relapse. It can be concluded from the data obtained that Hodgkin disease patients in clinical relapse present severe alterations in both cellular and humoral immunity.

Agradecimiento: Se agradece al señor director del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina, Dr. Alfredo Pavlovsky, por su constante apoyo; a los Dres. A. Suárez y M. de Tezanos Pinto por los enfermos facilitados para este estudio, y a la Sra. Gladys Hoffmann de Rojas por el mantenimiento de las líneas celulares utilizadas.

Bibliografía

1. Bianco C, Patrick T, Nussenzweig V: A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complement complexes. I. Separation and characterization. *J Exp Med* 132: 702, 1970.
2. Case DC, Hansen JA, Corrales E, Young CW, Dupont B, Pinsky C, Good RA: De-

pressed in vitro lymphocyte response to PHA in patients with Hodgkin's disease in continuous long remissions. *Blood* 49: 771, 1977.
3. Fuks Z, Strober S, Kaplan HS: Interaction between serum factors and T lymphocytes in Hodgkin's disease. Use as diagnostic test. *N Engl J Med* 295: 1273, 1976.
4. Graze PR, Perlin E, Royston I: In vitro lymphocyte dysfunction in Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst* 56: 239, 1976.
5. Henle G, Henle W: Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bact* 91: 1248, 1966.
6. Hinuma Y, Grace JT Jr: Cloning of immunoglobulin producing human leukemic and lymphoma cells in long term cultures. *Proc Soc Exp Biol Med* 124: 107, 1967.
7. Holm G, Mellstedt H, Bjorkholm M, Hohansson B, Killander D, Sundblad R, Soderberg G: Lymphocyte abnormalities in untreated patients with Hodgkin's disease. *Cancer* 37: 751, 1976.
8. Jones ES, Salmon SE: Immunodeficiency in non Hodgkin's lymphomas. Relation of immune status to histology. *Blood* 44: 928, 1974.
9. Lukes RJ, Carver LF, Hall TC, Rappaport H, Rubens P: Report on nomenclature Committee. *Cancer Res* 26: 1131, 1966.
10. Mochanko K, Fejes M, Brezavscek DM, Suárez A, Bachmann AE: The relation between EB virus antibodies and clinical symptomatology and immunodeficiency in patients with Hodgkin's disease. *Cancer* 44: 2065, 1979.
11. Reedman BM, Klein G: Cellular localization of an Epstein-Barr (EBV) associated complement fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int J Cancer* 11: 499, 1973.
12. Royston I, Graze PR, Pitts RB: Failure of cultures of human T cell lymphoid lines to stimulate in mixed leukocyte cultures. *Natl Cancer Int* 53: 361, 1974.
13. Ruibal Ares B, Sasiain MC, Brezavscek DM, Suárez A, Bachmann AE: Valoración de inmunodeficiencia de pacientes con linfomas en remisión y en recaída clínica. *Sangre* 23: 535, 1978.
14. Sasiain MC, Ruibal Ares B, Suárez A, Bachmann AE: Cultivo mixto de linfocitos (M LC). Correlación con la prueba cutánea a la PPD en pacientes con linfomas no-Hodgkin. *Sangre* 24: 424, 1979.
15. Sheidegger JJ: Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse. *Int Arch Allergy* 7: 103, 1955.
16. Thornsby E, Battlie A: A rapid method for preparation of lymphocyte suspensions. Histocompatibility testing. P. I. Terasaki (ed), Copenhagen Munskgaard, 1970.
17. Young RC, Corder PM, Haynes HA, De Vita VT: Delayed hypersensitivity in Hodgkin's disease. A study of 103 untreated patients. *Am J Med* 52: 63, 1972.

— — — —

While the artist's communication is linked forever with its original form, that of the scientist is modified, amplified, fused with the ideas and results of others, and melts into the stream of knowledge and ideas which form our culture. The scientist has in common with the artist only this: that he can find no better retreat from the world and also no stronger link with the world than his work.

Lo comunicación del artista está indisolublemente ligada a su forma original mientras que la del científico se modifica, amplía y combina con las ideas y los resultados de otros, incorporándose al cuerpo de conocimientos e ideas que forman nuestra cultura. El científico tiene en común con el artista el hecho que encuentra en su trabajo un refugio del mundo y, a la vez, el medio que le permite establecer un estrecho vínculo con él.

MAX DELBRÜCK
Nobel Prize address, 1969

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 293-296 (1981)

EL CROMOSOMA Ph[1] EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

SU VALOR DIAGNOSTICO Y PRONOSTICO

MABEL LABAL DE VINUESA *, SONIA BRIEUX DE SALUM **

Departamento de Cultivo de Tejidos y Citogenética, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Las leucemias son las neoplasias hematológicas más ampliamente estudiadas desde el punto de vista citogenético, siendo en los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) donde primero se observó una anomalía citogenética específica [7] dada por la pérdida de material de un cromosoma del grupo G, que se llamó cromosoma Filadelfia o Ph[1], y que actualmente, a través de las técnicas de bandeo se pudo establecer, que es debido a una traslocación t(9q+;22q−) [10]. La presencia del cromosoma Ph[1] permite diferenciar dos grupos dentro de la LMC, uno Ph[1]+ (70–85 %) y el otro Ph[1]− (15–30 %) [6, 11]. El análisis de un grupo de pacientes nos permitió obtener resultados que apoyan la importancia del estudio citogenético sobre el valor diagnóstico y pronóstico en LMC.

Material y métodos

Se estudiaron 48 pacientes provenientes de las Secciones Clínica Médica y Oncohematología del Instituto de Investigaciones Hematológicas (Tabla 1).

TABLA 1. — *Diagnóstico del cromosoma Ph[1] en los pacientes estudiados*

Diagnóstico	Ph[1] +	Ph[1] —	Total
LMC *	31 (77.5 %)	6 (22.5 %)	37
ME **		11	11
Total			48

* LMC: Leucemia mieloide crónica; ** ME: Mieloesclerosis.

El análisis citogenético se efectuó por método directo con material de médula ósea obtenido por punción de cresta ilíaca o esternón y aspiración de aproximadamente 1 ml de material medular puesto en medio de cultivo.

El estudio cromosómico se realizó con técnica standard y de bandeo G [14], analizando entre 11 y 20 metafases por paciente.

El análisis estadístico se efectuó con el test de X^2 [2] y la nomenclatura utilizada, fue la establecida en la Conferencia de París [8].

Resultados

En los 48 pacientes estudiados se buscó la presencia del cromosoma Ph[1] y/o de alguna otra anomalía cromosómica como aneuploidías, traslocaciones, deleciones.

Del total de los pacientes, 11 de ellos por diagnóstico clínico posterior, correspondieron a otro síndrome mieloproliferativo (SMP) del tipo mieloesclerosis, de-

Recibido: 10-XII-1980. Aceptado: 1-IV-1981.

*Becaria del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET.

Dirección postal: Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina.

Fig. 1. — Cromosomas 9 y 22 y traslocación t(9q+; 22q—) con sus respectivos diagramas.

tectándose en los mismos aneuploidías diversas e inespecíficas; en ninguno de ellos se observó la presencia del cromosoma Ph[1] (Tabla 1). El 22.5 % de los pacientes con LMC no presentó el cromosoma Ph[1] (Ph[1]–). El 77.5 % restante mostró la característica traslocación t(9;22) (Ph[1]+) en el 70 al 100 % de las células analizadas (Fig. 1). Los resultados obtenidos de nuestros estudios permiten determinar claramente dos subpoblaciones de LMC: LMC-Ph[1]+ y LMC-Ph[1]–. Al comparar ambos grupos por las características hematológicas presentes al comienzo de la enfermedad, se observaron los resultados enunciados en la Tabla 2, en la que podemos apreciar que los pacientes Ph[1]+ presentaron mayor cantidad de leucocitos y plaquetas en sangre periférica (SP) que los pacientes Ph[1]–, hallando diferencias altamente significativas entre ambos, por medio de la prueba de X^2 con $p < 0.001$. Cuando se compararon los pacientes muertos en ambos grupos teniendo en cuenta la evolución de la enfermedad (Tabla 3)

TABLA 2. — *Parámetros comparados en LMC-Ph[1] + y LMC-Ph[1] –*

	Ph[1] +	Ph[1] –
Leucocitos	119 270/mm³	39 000/mm³ *
Plaquetas	180 % *	37 % *

* $p < 0.001$.

se observa que el grupo Ph[1]– tiene mal pronóstico respecto del grupo Ph[1]+.

Cariotipos 46, XX o 46, XY con o sin cromosoma Ph[1] fueron característicos para 32 pacientes con diagnóstico clínico-citogenético de LMC en fase crónica, al momento del estudio.

A los 5 pacientes restantes se les efectuó diagnóstico citogenético de crisis blástica; 2 de ellos coincidiendo con el diagnóstico clínico mientras que los 3 restantes, al momento del estudio, se encontraban clínicamente en fase crónica.

El análisis citogenético de estos cinco pacientes mostró que uno de ellos se hallaba en crisis blástica con ausencia de Ph[1], presencia de trisomía 8 y de una translocación t(12;13) con el siguiente cariotipo: 46, XY, +8, –13, +der(13), t(12;13) (q11;p11) [4].

Los 4 pacientes restantes, con un cariotipo 46, XX, Ph[1] + o 46, XY, Ph[1] + propio de fase crónica citogenética, en el momento de la crisis blástica el 100 % de los mis-

TABLA 3. — *Evolución de la enfermedad en pacientes * Ph[1]– y Ph[1]+*

Pacientes	Control clínico (m) de la enfermedad	Sobrevida (m)	Causa muerte
Ph –			
1	—	11	C.B
2	—	4	C.B
Ph +			
1	1	3	shock séptico
2	—	4	C.B
3	50	52	C.B
4	9	10	C.B
5	25	26	C.B
6	32	34	C.B

(m): meses; (*): fallecidos; C.B.: crisis blástica.

mos mostró doble Ph^1 y el 75 %, la trisomía del cromosoma 8 (Fig. 2).

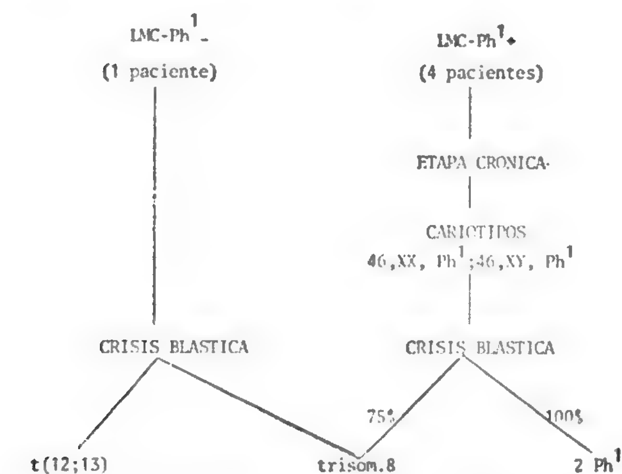


Fig. 2. — Anomalías cromosómicas en 5 pacientes en crisis blástica citogenética.

Discusión

Sin lugar a dudas el advenimiento de las técnicas de bandeo cromosómico constituye un valioso aporte a la citogenética clínica y hematológica habiéndose podido determinar la existencia en muchos cromosomas de regiones específicamente afectadas como se observa en el cromosoma Ph^1. Este hallazgo apoya la teoría de Boveri que sostiene que existe una relación entre una neoplasia y cambios cromosómicos específicos [5].

En nuestros estudios los pacientes con síndromes mieloproliferativos (SMP) del tipo mieloesclerosis no presentaron el cromosoma Ph^1 pero sí aneuploidías inespecíficas, apoyando el valor diagnóstico de este cromosoma. Por otro lado, los pacientes con LMC en fase crónica siempre presentaron cariotipos 46, XX o 46, XY con o sin Ph^1 y sin otra alteración cromosómica adicional. Cuando se observó evolución clonal o alguna alteración específica, como trisomía del cromosoma Nº 8 o doble Ph^1, se tomó como indicativo de crisis blástica, corroborada clínicamente en el 100 % de los casos. Es importante destacar que detectamos la crisis blástica a través del estudio citogenético en forma previa a su manifestación clínica por tratarse de 3 pacientes que presentaban la enfermedad clínicamente en su fase crónica. Se debe resaltar que fue posible determinar la presencia del cromosoma Ph^1, 2 a 3 meses antes del diagnóstico clínico de la enfermedad en tres pacientes que presentaban displasia hematopoyética (8.1 por ciento).

Nuestros resultados permiten apoyar lo postulado por Sandberg (1980) [12] que el cromosoma Ph^1 sólo se halla en LMC, no existiendo otro síndrome mieloproliferativo que lo presente, y que su aparición aun sin síntomas clínicos de la enfermedad, es diagnóstico de LMC. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el cromosoma Ph^1, según algunos hallazgos citogenéticos esporádicos no sería una anomalía exclusivamente hallada en LMC, ya que una anomalía cromosómica morfológicamente indistinguible del Ph^1 ha sido encontrada en Leucemia Mieloblástica Aguda [1] y en Leucemia Linfoblástica Aguda [9].

Algunos autores [3] consideran a la LMA como un síndrome mieloproliferativo, no así a la LLA. Asimismo, puntos de diferencia pueden hallarse entre LMA Ph^1+ y una crisis blástica LMC Ph^1+ [13] diferencia que radica en la distribución de esas células con Ph^1 positividad ya que en LMC, el 100 % de las células de médula ósea son Ph^1+ mientras que en LMA se puede observar una mezcla de células Ph^1 y células normales, con ausencia absoluta de doble Ph^1. En cuanto a la LLA-Ph^1+, es un subtipo distinto de LLA juvenil en la que los datos clínicos, morfológicos, citoquímicos e inmunológicos son consistentes de una LLA típica indicando que la identificación de estos casos sólo se logra por análisis citogenético.

Además, hemos observado que existen diferencias altamente significativas entre las dos subpoblaciones de LMC, Ph^1+ y Ph^1- en cuanto a cantidad de plaquetas y recuento de leucocitos al comienzo de la enfermedad y sobrevida de los pacientes. Esto permitiría separar a la LMC-Ph^1- como una entidad diferente dentro de los síndromes mieloproliferativos, tanto desde el punto de vista citogenético como clínico, ya propuesto por Mintz (1979) [6]. Es por tanto indudable el valor diagnóstico de este cromosoma en la diferenciación entre LMC-Ph^1+ y Ph^1-, como así también su eficaz valor pronóstico, en la detección precoz de crisis blástica.

Resumen

Se hizo el estudio citogenético de un grupo de 48 pacientes con diagnóstico de Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y otros síndromes mieloproliferativos. Se utilizó el método directo de análisis, con material de médula ósea, coloreándose los preparados con técnica standard y de bandeo G, analizando entre 11 y 20 metafases en cada caso. Para la valoración estadística de los datos se aplicó el test de X^2. Los resultados obtenidos permiten determinar claramente dos subpoblaciones de LMC: LMC-Ph^1+ y LMC-Ph^1—. Las diferentes características hematológicas al comienzo de la enfermedad y su evolución clínica revelaron mayor cantidad de leucocitos y plaquetas en sangre periférica y mayor sobrevida en los casos Ph^1+. Nuestros resultados apoyan lo postulado por Sandberg [13] que el cromosoma Ph^1 sólo se halla en LMC, no existiendo otro síndrome mieloproliferativo que lo presente, y que su aparición aun sin síntomas clínicos de la enfermedad es diagnóstico de LMC; y por otro lado, como lo sugiere Mintz [6], que la LMC-Ph^1— puede ser considerada como una entidad diferente dentro de los síndromes mieloproliferativos.

Summary

PH¹ CHROMOSOME IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA. DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC VALUE.

Chromosomal analysis was performed on 48 cases of Chronic Myeloid Leukemia (CML) in the chonic phase, and of myeloproliferative syndromes. In each specimen, 11-20 metaphases from bone marrow cells were analysed by use of Giemsa banding. A total of 31 patients had the common type of Ph^1, translocation t (9; 22); 6 cases of the 17 patients Ph^1 negative could be diagnosed as CML and 11 as myeloproliferative syndromes (myelosclerosis) (Table 1). It was observed that the patients with the Ph^1 chromosome have a much longer median survival than patients who were Ph^1 negative and showed higher number of leucocytes and megacaryocytes in peripheral blood counts (Table 2). A change in the karyotype of a Ph^1 negative patient, with unusual t (12; 13) preceeded by 2 months the clinical signs of the blast crisis. Chromosomal analysis of bone marrow cells by use of banding techniques is a valuable guide to the clinician in the diagnosis and prognosis of CML, suggesting that Ph^1 negative CML is a different entity within mieloproliferative syndromes.

Bibliografía

1. Abe S, Sandberg AA: Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXXII features of Ph¹-positive Acute Mieloblastic Leukemia (AML), including a review of the literature. *Cancer* 43: 2352, 1979.
2. Bliss C: Statistics in Biology, McGraw Hill, USA, 1967.
3. Dameshek W: Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 6: 372, 1951.
4. Labal de Vinuesa M, Slavutsky I, Dupont J, Di Risio C, Salum SB: Ph¹-negative chronic myelocytic leukemia (CML) with an unusual karyotype. *Cancer Genet Cytogenet* (en prensa).
5. Levan G, Mitelman F: Clustering of aberrations in specific chromosomes in human neoplasms. *Hereditas* 79: 156, 1975.
6. Mintz J, Vardiman J, Golomb HM, Rowley JD: Evolution of karyotypes in Philadelphia (Ph¹) chromosome negative chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 43: 411, 1979.
7. Nowell PE, Hungerford DA: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497, 1960.
8. Paris Conference (1971): Standardization in human cytogenetics. Birth defects. Original Article Series III: Nº 7, New York, The National Foundation, 1972.
9. Priest JR, Robinson LL, McKenna RW, Lindquist LL, Warkentin PI, LeBien TW, Woods WG, Kersey JH, Coccia PF, Nesbit ME: Philadelphia chromosome positive childhood. Acute linfoblastic leukemia. *Blood* 56: 15, 1980.
10. Rowley JD: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290, 1973.
11. Rowley JD: Chromosome abnormalities in cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2: 175, 1980.
12. Sandberg AA: The cytogenetics of chronic myelocytic leukemia (CML): chronic phase and blastic crisis. *Cancer Genet Cytogenet* 1: 217, 1980.
13. Sandberg AA: The chromosomal in human cancer and leukemia. Elsevier North Holland, 1980, p 327.
14. Seabright M: A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971, 1971.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 297-300 (1981)

ESTUDIO CITOGENETICO EN PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS

IRMA SLAVUTSKY *, SONIA BRIEUX DE SALUM **

Departamento de Cultivo de Tejidos y Citogenética, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Estudios recientes indican que los rearreglos cromosómicos observados en el tejido neoplásico, e identificados con técnicas de bandeo, no se producen al azar [16]. Este hallazgo sustenta la hipótesis que propone que un cambio cromosómico puede ser un mecanismo involucrado en la transformación maligna de las células [12]. El análisis citogenético de los linfomas malignos permitió detectar en ellos la presencia de estos cambios cromosómicos, constituyendo uno de los campos más interesantes dentro de la investigación de estas neoplasias [2, 3, 7]. En este trabajo se presenta el estudio citogenético de 25 pacientes con diferentes procesos linfoproliferativos y se indican las anomalías cromosómicas detectadas en los distintos tipos histológicos analizados.

Material y métodos

Se efectuó el estudio citogenético de biopsias ganglionares de 25 pacientes del Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", con diferentes procesos linfoproliferativos. Los casos estudiados se exponen en la Tabla 1.

TABLA 1. — *Total de pacientes estudiados*

Linfoadenitis inespecíficas	8
Hiperplasias gigantofoliculares	2
Enfermedad de Hodgkin	5
Linfomas no-Hodgkin	10
Total	25

El material fue procesado por método directo y cultivo a corto plazo (24-48 horas) en medio F-10 con 15 % de suero fetal bovino.

El análisis cromosómico se efectuó con tinción standard y técnica de bandeo G [14].

En la interpretación de los rearreglos cromosómicos se utilizó la nomenclatura establecida en la Conferencia de París [1].

Los diagnósticos histológicos se efectuaron con la clasificación de Rappaport [11] para los linfomas no-Hodgkin y la de Lukes-Rye [6] para la enfermedad de Hodgkin.

Resultados

Los 8 pacientes estudiados con diagnóstico de linfoadenitis inespecíficas (5 mujeres y 3 hombres) presentaron cariotipos normales: 46, XX y 46, XY, respectivamente, constituyéndose en nuestro grupo control.

Los dos casos de hiperplasias gigantofoliculares presentaron anomalías numéricas inespecíficas, que afectaban a diferentes grupos cromosómicos (Tabla 2).

Recibido: 10-XII-1980. Aceptado: 1-IV-1981.

* Becaria del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET.

Dirección postal: Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina.

TABLA 2. — *Pacientes con hiperplasia gigantofolicular*

Caso	Aneuploidías	
	Hipo *	Hiper *
1	C,E,G	B,E
2	B,C,G	C,E,F

* Grupos cromosómicos afectados.

Los datos obtenidos en los 5 pacientes que presentaban enfermedad de Hodgkin se observan en la Tabla 3. Todos los pacientes presentaron anomalías numéricas; en dos de los casos estudiados se encontraron clones específicos: uno con el marcador 15q+ y otro con una trisomía completa del cromosoma 21.

TABLA 3. — *Pacientes con enfermedad de Hodgkin*

Caso	Histología	Estadío	Aneuploidía	Anomalías cromosómicas
1	PL	II B	+	15q+
2	EN	III A	+	+21
3	EN	III A	+	—
4	EN	IV B	+	—
5	DL	IV B	+	—

PL: Predominio linfocítico; EN: Esclerosis nodular; DL: Depleción linfocitaria.

Los resultados obtenidos en 10 pacientes con linfoma no-Hodgkin, así como su variedad histológica, se exponen en la Tabla 4. Estos casos comprenden 7 linfomas linfocíticos poco diferenciados difusos (LLPD-D), y 3 linfomas linfocíticos bien diferenciados nodulares (LLBD-N), todos ellos con importantes anomalías cromosómicas.

TABLA 4. — *Pacientes con linfomas no-Hodgkin*

Caso	Histología	Estadío	Aneuploidía	Anomalías cromosómicas
1	LLPD-D	II A	+	14q+
2	LLPD-D	III A	+ *	—
3	LLPD-D	III A	+	r/2r
4	LLPD-D	III B	+ *	6q—
5	LLPD-D	IV B	+	1q+, +3
6	LLPD-D	IV B	+	4n = 92
7	LLPD-D	IV B	+	+1
8	LLBD-N	IV A	+ *	1p+, 2p—
9	LLBD-N	IV B	+	1p+, 14q+
10	LLBD-N	IV B	+ *	1p+

* Poliploidías; LLPD-D: Linfoma linfocítico poco diferenciado difuso; LLBD-N: Linfoma linfocítico bien diferenciado nodular.

El 50 % de los casos estudiados presentó anomalías numéricas o estructurales del cromosoma 1; todas ellas dieron origen a trisomías totales o parciales del brazo largo de dicho cromosoma. (Fig. 1).

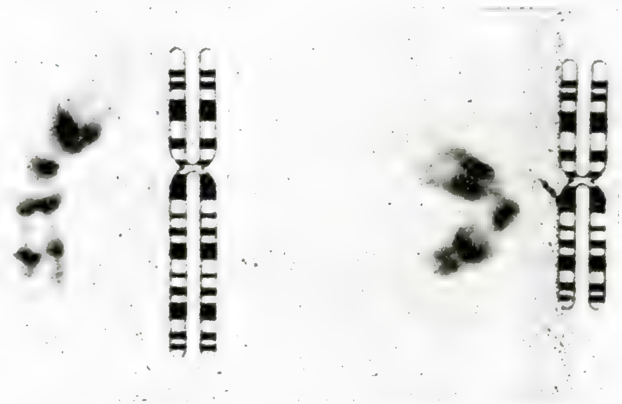


Fig. 1. — Marcador 1q+ y cromosoma Nº 1 normal con sus respectivos diagramas.

De los restantes pacientes 2 presentaron el marcador 14q+ característico de los procesos linfoides, 1 el marcador 6q- y en otro caso 3 se observaron 2 clones con uno y dos cromosomas en anillo, respectivamente. El origen de este cromosoma no pudo ser determinado debido al reducido tamaño del mismo y a las aneuploidías presentes en todas las metafases observadas.

El 50 % de los casos presentó aneuploidías, teniendo los casos 6 y 8 de la Tabla 4 todas sus células poliploides.

Discusión

En los diversos estudios citogenéticos realizados hasta el presente en pacientes con linfoma [9] se han detectado diferentes marcadores cromosómicos, entre los que cabe destacar: 14q+, 1p—, 11q—, 1q—, 9q—, 18q—, 3p— y 8q—, las trisomas 3, 7 y 18 y la monosomía de los cromosomías 8 y 15. En este estudio se destaca la presencia constante de alteraciones cromosómicas, ya sean numéricas o estructurales,

observadas en todos los ganglios de pacientes que presentaban neoplasias linfoideas, hecho que contrasta significativamente con los casos de linfoadenitis inespecíficas, portadoras de cariotipos normales. El hallazgo de aneuploidías inespecíficas en los 2 casos de hiperplasias gigantofoliculares es coincidente con lo observado por otros autores [5, 10].

Es muy escaso el número de pacientes con este proceso linfoproliferativo que ha sido estudiado desde el punto de vista citogenético. La detección sistemática de estas anomalías cromosómicas indica la importancia de efectuar estudio cromosómico y seguimiento en estos casos, a fin de determinar la evolución de estas alteraciones citogenéticas y su correlación clínica. Con respecto a la enfermedad de Hodgkin, nuestros casos se caracterizan por presentar número diploide de cromosomas, no observándose ningún caso de hipotetraploidía [5]. No se ha visto todavía especificidad en los marcadores encontrados, siendo necesario incrementar el número de casos para poder determinar si existe alguna correlación con histología y estadío clínico. Sin duda las observaciones más importantes corresponden a los linfomas no-Hodgkin, siendo notables la alta incidencia de afectación del cromosoma Nº 1 en nuestra serie. Rowley [18] en 1978 señaló la relación existente entre duplicación de parte del brazo largo de dicho cromosoma y el aumento de malignidad celular. La aparición de duplicación de parte del brazo largo del cromosoma Nº 1 en 5 de los 6 pacientes estudiados en estadío IV de la enfermedad, la mala evolución clínica y la escasa respuesta al tratamiento observada en todos ellos, nos indica el alto valor pronóstico de esta alteración [15]. Es de destacar también la presencia en 2 de nuestros casos del 14q+, marcador relacionado con el desarrollo del tejido linfoide [7]. Debe ser destacado que las alteraciones encontradas en los linfomas no-Hodgkin indican cambios cariotípicos no al azar con jerarquía pronóstica.

Resumen

El estudio citogenético de los linfomas malignos permitió detectar en ellos la presencia de cambios cromosómicos que no se producen al azar. En este trabajo se presenta el estudio de 25 pacientes con procesos linfoproliferativos; de éstos, 8 pacientes tenían diagnóstico de linfoadenitis inespecífica con cariotipos normales, 2 hiperplasias gigantofoliculares mostrando anomalías numéricas no específicas, 5 enfermedad de Hodgkin y 10 linfomas no-Hodgkin. Todos los pacientes con linfomas malignos presentaron anomalías cromosómicas ya sea numéricas o estructurales. Se destaca la alta incidencia de alteraciones del cromosoma Nº 1 y su correlación con aumento de malignidad celular.

Summary

Chromosomal aberrations in lymphoproliferative diseases

Observations by banding techniques in lymphomas have revealed a large number of recurrent aberrations particularly structural ones. The aim of this report was to investigate the presence of these important chromosomal alterations, known as markers. A total of 25 lumph nodes from lymphoproliferative diseases were studied as fresh preparations, and short term cultures for 24-48 hs in F-10 supplemented with 15 % fetal calf serum, employing G banding and the nomenclature of the Paris Conference. The clinicopathological characteristics of the patients are listed in Table 1. The histological diagnosis was made according to the classification of Rappaport. All patients were untreated at the time of the chromosome studies. Table 2 shows that abnormal chromosome counts and karyotypes were observed in gigantofollicular hyperplasia. Numerical and structural chromosomal changes in Hodgkin's lymphoma are shown in Table 3. A stem-line with a 15q+ marker was found in case 1 and a 21 trisomy in case 2. The results of the 10 non-Hodgkin lymphomas are summarized in Table 4: chromosome 1 was mostly involved in the rearrangements and 1q+; 1p+ and 1+ were recurrent markers in 50 % of the cases; 14q+ was present in 20 % of the cells.

Bibliografía

1. Conferencia de París, 1971: Standardization in human citogenetics. Birth Defects: Original Article Series, vol. 8. Nº 7 (The National Foundation, New York, 1972).
2. Fukuhara S, Rowley J: Chromosome 14 translocation in non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 22: 14, 1978.
3. Fukuhara S: Significance of 14q translocation in non-Hodgkin lymphomas. *Virchows Arch B Cell Path* 29: 99, 1978.
4. Hossfeld D: Chromosome findings in effussions from patients with Hodgkin disease. Chromosome Today, vol. 6, A. de la Chapelle and M. Sorsa (eds). Elsevier/North-Holland, Biochemical Press, Amsterdam, 1977. 31 (Suppl II): 162, 1975.
5. Lawler SD, Reeves BR, Hamlin IME: A comparison of cytogenetics and histopathology in malignant lymphomata. *Br J Cancer* Committee. *Cancer Research* 26 (Part I):
6. Lukes RJ, Craver LF, Hall TC, Rappaport H, Ruben P: Report of the Nomenclature Committee. *Cancer Research* 26 (Part 1): 1311. 1966.
7. Mc Caw B, Hecht F, Harnden D, Teplitz RL: Somatic rearrangement of chromosome 14 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci* 72: 2071, 1975.
8. Mark J, Ekendahl C, Dahlenfors R: Characteristics of the banding patterns in non-Hodgkin and non-Burkitt lymphomas. *Hereditas* 88: 229242, 1978.
9. Mark J, Dahlenfors R, Ekedahl C: Recurrent chromosomal aberrations in non-Hodgkin and non-Burkitt lymphomas. *Cancer Genetic Cytog* 1: 39, 1979.
10. Pierre R: Cytogenetics in malignant lymphoma. *Virchows Arch B Cell Path* 29: 107, 1978.
11. Rappaport H: Tumors of the hematopoietic system. Atlas of Tumor Pathology, Section III, Fascicle 8, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., 1966.
12. Rowley J: Do human tumors show a chromosome pattern specific for each etiologic agent? *J Natl Cancer Inst* 52: 315, 1974.
13. Rowley J: Abnormalities of chromosome Nº 1: Significance in malignant transformation. *Virchows Arch B Cell Path* 29: 139, 1978.
14. Seabright M: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304, 1972.
15. Slavutsky I, Labal de Vinuesa ML, Dupont J, Mondini N, Salum S de B: Abnormalities of chromosome Nº 1: Two cases with lymphocytic lymphoma. *Cancer Genet Cytog* (en prensa).
16. Zech L, Haglund V, Nilsson K, Klein G: Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 17: 47, 1976.

— — — —

Education is a lifelong process, in which the student can only make a beginning during his college course... The hardest conviction to get into the mind of a beginner is that the education upon which he is engaged is not a college course, but a life course for which the work of a few years under teachers is but a preparation.

La educación es un proceso que dura toda la vida, en el cual el estudiante recién comienza durante su paso por la Universidad... Lo más difícil para un principiante es convencerse que la educación que está adquiriendo no es un curso universitario sino un curso de toda la vida, para lo cual el trabajo de unos pocos años bajo la tutela de profesores es sólo una preparación.

SIR WILLIAM OSLER (1849-1919)

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 301-308 (1981)

ELECTROPHYSIOLOGICAL INVESTIGATION OF THE SKELETAL MUSCLE IN PERONEAL MUSCULAR ATROPHY

R. E. P. SICA, OLGA PAULINA SANZ, J. X. DE CASTRO, ALICIA CUETO

Sección de Electroneurofisiología Clínica, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires

In the last few years increasing attention has been paid to Peroneal Muscular Atrophy (PMA) and many authors have devoted themselves to the apparently complex problem of its nosological location distinguishing the various groups which integrate this disorder [2-4, 7-9, 15, 18, 19]. Most of this work has related the clinical manifestations, the inheritance pattern, the nerve conduction velocities and the pathological appearance of the peripheral nerves. This paper will deal with the behaviour of the skeletal muscle motor units (m.u.) in a group of patients who were studied in our laboratory in the last few years and who fullfilled all the clinical requisites needed to be considered as affected by PMA.

Material and methods

Subjects: Altogether 22 patients were studied; 10 of them were males and 12 females. Their ages ranged from 5 to 51 years. Coincidental causes of muscle denervation were excluded by rejecting patients with toxic or metabolic disorders known to produce nervous damage. This study does not include patients over 60 years of age to avoid confusion with the ageing processes which normally occur after this age [5, 17].

Controls: A total of 262 normal subjects with ages ranging from 2 to 60 years were employed as controls, for one or more investigations.

Methods:

1. Nerve conduction studies: motor and sensory conduction velocities, as well as motor terminal latencies and sensory compound action potentials amplitude were studied with surface electrodes by employing conventional techniques. When possible, the median, ulnar, deep peroneal and sural nerves were investigated in the same subject, but at least two nerves were explored in all them.

2. Estimation of the numbers and sizes of functional m.u.: two or more muscles were examined by the m.u. counting techniques in all the patients. The muscles explored were the thenar and hypothenar groups, the extensor digitorum brevis (edb) and the soleus. The details of the techniques have been fully described elsewhere [11, 16, 17].

3. Conventional electromyogram: conventional electromyography, with coaxial needle electrodes, was also performed in proximal and distal muscles of the upper and lower limbs. This technique was employed as a complement of the other methods at the end of the whole procedure to reinforce the other findings, but no quantitative analysis of the data was done.

Statistical treatment: Means have been expressed with 1 SD throughout the text. Significance of differences between means were calculated by using the Student "t" test. Pearson correlation coefficient (r) was also employed for studying the relationship between two variables. Linear regression lines were calculated by employing the formula $y = mx + c$.

Received: 31-X-1980. Accepted: 18-III-1981.

Postal address: Servicio de Neurología, Hospital Ramos Mejía, Urquiza 609, 1221 Buenos Aires, Argentina.

Results

1. *Nerve conduction studies:* It is well known that measurements of motor conduction velocities may give very low values in nerves directed to severely denervated muscles, the reason for this being axonal atrophy, segmental demyelination and/or the presence of regenerating axons. Although in all patients attempts were made to study the conduction velocities in nerves of the lower limbs, in the end we found that the most suitable nerve to discriminate among the affected subjects was the median, as previously advocated by Thomas et al [18] and Bradley [3].

Altogether 20 median nerves were examined; of the remaining 2 patients, one of them showed complete denervation of the thenar muscles at the time of the investigation, while in the other, only data of the lower limbs could only be obtained. Figure 1 shows the conduction velocity

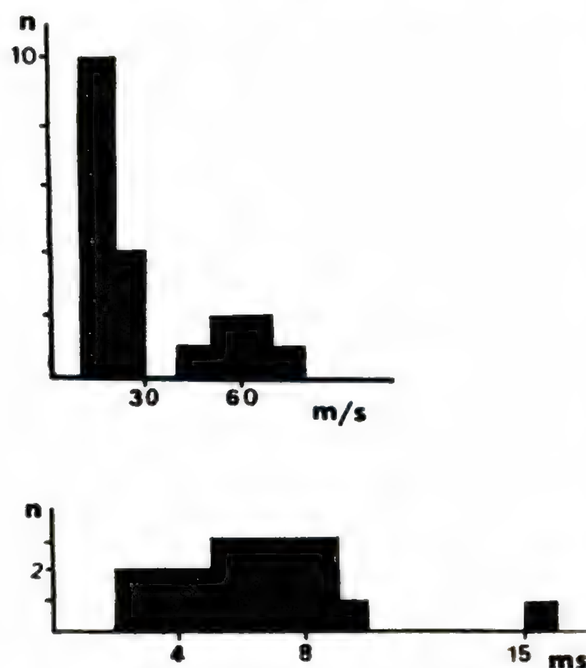


Fig. 1. — Upper histogram: median nerve maximal motor conduction velocities. n: number of patients. Lower histogram: Median nerve motor terminal latencies. n: number of patients.

values of the fastest conducting motor nerve fibres (m.c.v.). Two groups of patients could be distinguished; the first one (group I), which comprised most of them, had values ranging between 10 an 30 m/s, while the second (group II) showed values between 42 and 73 m/s. When their means were compared, it was found that group I (mean: 19.66 ± 5.49 m/s) was significantly much slower ($p < 0.001$) than group II (mean: 61.12 ± 11.49 m/s). The control population of our laboratory has values ranging between 52 and 71 m/s, with a mean of 58.27 ± 5.24 m/s, which significantly differs from group I ($p < 0.001$), but not from group II. Neither in group I nor in group II could any relationship be found between m.c.v. and age, and the Pearson correlation coefficient was not significant for both groups (r, group I: 0.16; group II: 0.31).

Median nerve terminal motor latencies showed a continuous spectrum of values from 2.2 up to 10 ms; only one patient had values over 15 ms (Fig. 1). There was a close relationship between median m.c.v. and motor terminal latencies, these last values being more prolonged when the conduction velocities were slower (r: −0.68, $p < 0.01$). Only 6 out of the 20 patients studied also showed reduced median sensory conduction velocities (s.c.v.) and diminished amplitude of the sensory compound action potentials; all of them belonged to group I.

2. *Number of m.u.:* Figure 2 shows the number of functional m.u. in the thenar, hypothenar, edb and soleus muscles. It can be seen that most of the values fall below the lower limit of the control group for each muscle investigated. From this figure, it is also apparent that the edb was the most severe denervated muscle, 50 % of the patients showed complete denervation at the time of the investigation. The same figure shows that the loss of operative m.u. was similar for groups I and II; furthermore, when their means were compared no significant difference was found between them (Table 1).

The study of the correlation between age and numbers of functional m.u. showed that all the correlation coefficients had negative values (Table 2). However, only those belonging to group I in thenar and edb muscles had a very weak statistical significance.

As far as impulse conduction velocity is concerned, no correlation was found between median nerve motor or sensory conduction velocities and number of operative m.u. in the thenar muscles (r, m.c.v./

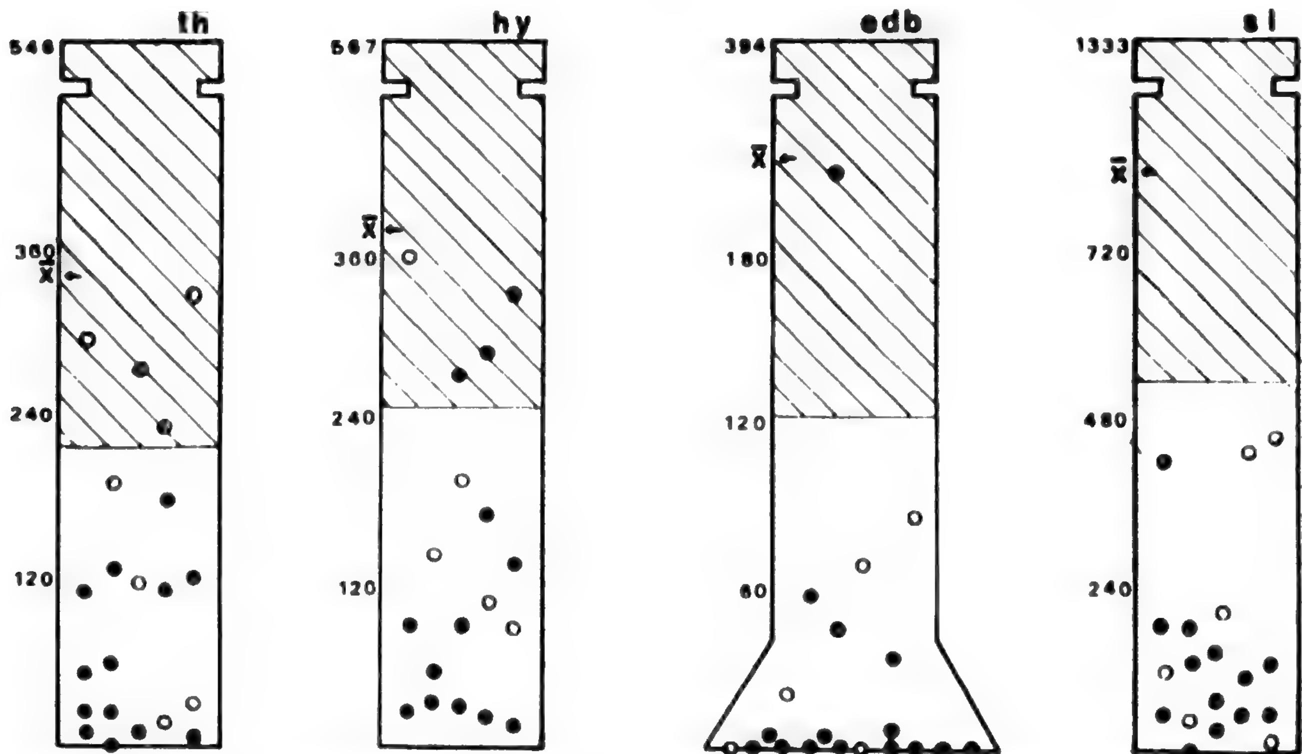


Fig. 2. — Number of functioning motor units in the thenar (th), hypothenar (hy), edb and soleus (sl) muscles. Hatched areas show ranges of control values. Arrows indicate normal mean values. Group I: filled circles. Group II: open circles.

number m.u.: group I, 0.08; group II, 0.48; r, s.c.v./number m.u.: group I, 0.19; group II, 0.30). There was no correlation either between the amplitudes of the median sensory compound action potentials and the loss of operative m.u. in the same muscles (r, group I: 0.23; group II: 0.30).

3. *Size of the remaining m.u.:* In previous papers reasons were given to support the concept that the amplitude of the potential evoked by a single m.u. is proportional to the number of muscle fibres that a single axon supplies [11, 12]. Therefore, an estimation of the size of a m.u. can be acquired by measuring the amplitude of the potential it generates.

In other denervatory conditions it was noted that the remaining m.u. enlarged their territories as the number of functional m.u. diminished due, most probably, to sprouting of their axons and adoption of previously denervated muscle fibres [12]. In PMA the remaining m.u. showed a tendency to enlarge their territories in the four muscles explored. However, this ten-

TABLA 1. — *Mean number of functional motor units*

Muscles	Controls	Group I	Group II
Thenar	318 ± 70 (67)	92 ± 87 (15)	166 ± 133 (6)
Hypothenar	379 ± 79 (70)	120 ± 113 (13)	178 ± 109 (5)
e d b	215 ± 69 (34)	24 ± 55 (15)	34 ± 39 (5)
Soleus	841 ± 183 (101)	113 ± 107 (13)	252 ± 185 (6)

Groups I and II do not differ significantly between them, but both differ from controls at the level of 1/100 or more. In brackets, number of subjects.

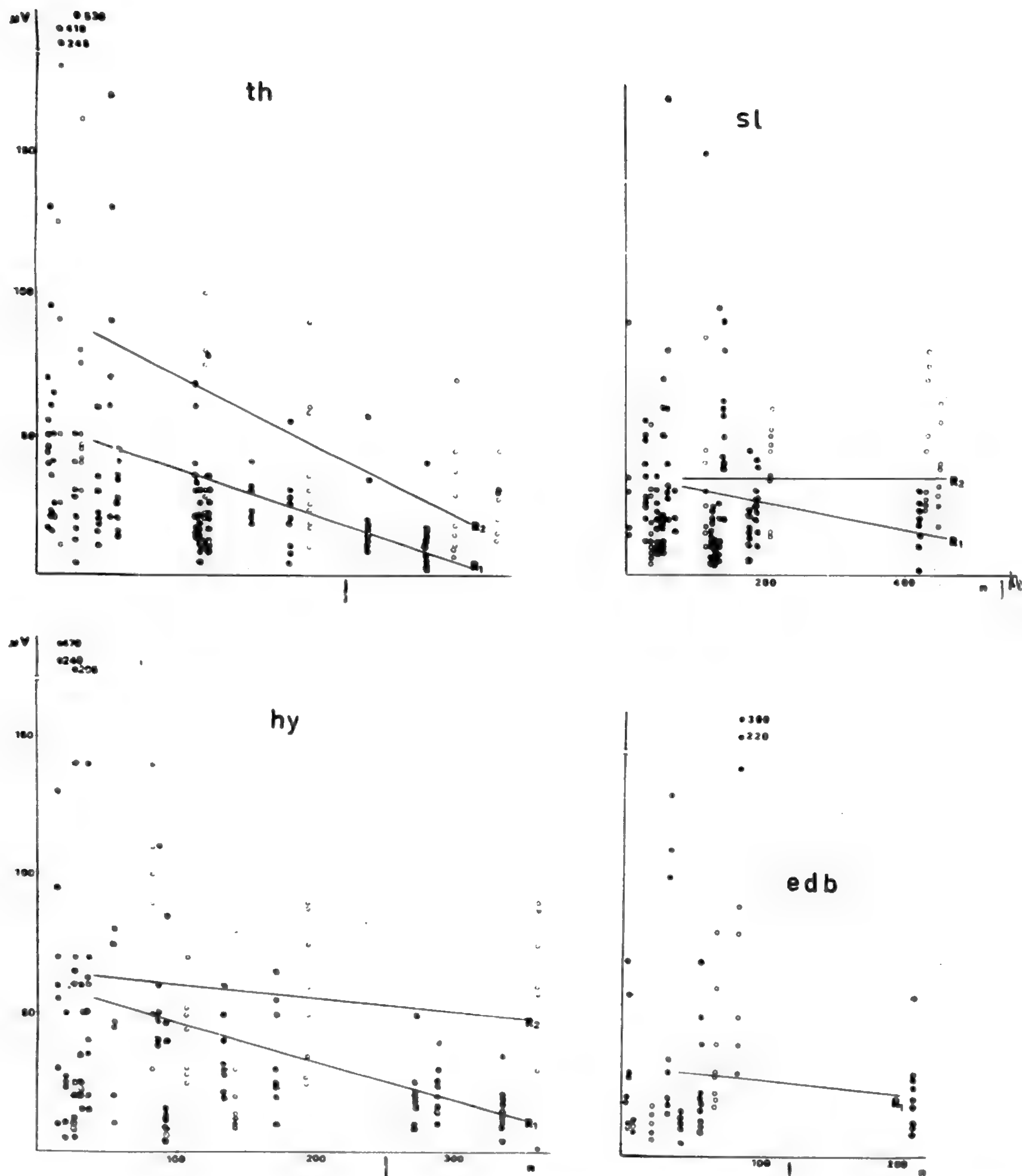


Fig. 3.— Number of functioning motor units against their size in the thenar (th), hypothenar (hy), edb and soleus (sl) muscles. On ordinates sizes of the motor units in μV. On abscissae numbers of motor units (n). Bars signal the lower limit of the control populations. Filled circles: group I. Open circles: group II. R_1: linear regression lines for group I. R_2: linear regression lines for group II. (Group II linear regression line of of the edb muscle was not calculated owing to insufficient data).

TABLE 2. — *Correlation coefficients between numbers of functional motor units and patients' age*

Muscles	Group I	p	Group II	p
Thenar	− 0.52 (n 15)	< 0.05	− 0.26 (n 6)	n s
Hypothenar	− 0.36 (n 13)	n s	− 0.23 (n 5)	n s
e d b	− 0.48 (n 15)	< 0.1	− 0.22 (n 5)	n s
Soleus	− 0.33 (n 13)	n s	− 0.44 (n 6)	n s

n in brackets signals number of data pairs; n s: not significant.

dency was very weak in muscles of the lower limbs and in the hypothenar muscles of patients belonging to group II (Fig. 3). Table 3 shows that the correlations between numbers of the remaining operative m.u. and their size were only significant in the thenar muscles for both groups of patients and in group I of the hypothenar muscles.

TABLE 3. — *Correlation coefficients between numbers of functional motor units and their mean size*

Muscles	Group I	p	Group II	p
Thenar	− 0.64 (n 14)	< 0.02	− 0.76 (n 6)	< 0.1
Hypothenar	− 0.64 (n 13)	< 0.02	− 0.62 (n 5)	n s
e d b	− 0.12 (n 7)	n s		
Soleus	− 0.36 (n 12)	n s	− 0.31 (n 6)	n s

n in brackets signal number of data pairs; n s, not significant. Group II of the e db muscle was not calculated owing to insufficient data.

4. *Conventional electromyography:* Most of the patients, in either group, showed a reduced interference pattern in distal muscles of the upper and lower limbs. The remaining potentials were fragmented or polyphasic and some of them had enlarged emplitude and increased duration. Occasional fibrillations and positive sharp waves were also seen.

Discussion

Maximal motor nerve fibres conduction studies showed a clear distinction between two groups of patients. One of them, denominated group I, was the largest and had marked slowness of the median m.c.v. About 43 % of these patients also had slow sensory conduction velocity and diminished amplitude of the sensory compound action potentials. Group II was composed of fewer patients with normal or slightly reduced m.c.v. and normal s.c.v. and amplitudes of the sensory compound action potentials. Most probably these two groups correspond to the hypertrophic (group I) and neuronal (group II) types described by Dick and Lambert [8, 9].

An interesting phenomenon is the lack of correlation between m.c.v. in the median nerve and age. This observation, which has previously been reported in the literature [10, 19], might be due to the great variability in the age of clinical onset [14]. Therefore, in a study of this kind it is not possible to expect any correlation between age and m.c.v. Apparently, the only way to obtain a reasonable answer would be to make a longitudinal study such as the one carried out by Pinelli et al [14] who found a progressive slowness of m.c.v. within the peroneal nerves in patients with the hypertrophic and neuronal types of the disease.

Turning now to the m.u. counting results, we failed to find any relationship between number of operative m.u. in the thenar muscles and m.c.v. in the median nerve. This observation might, perhaps, be related to the findings of Aguayo et al [1] who showed that by grafting nerves of patients with PMA into normal mice nerves, the axons of the host were barely myelinized by the Schwann cells of the donor, suggesting that abnormalities of these cells may well play a role in the development of the disease. If this phenomenon affects axons randomly, it is possible to expect very different degrees of axon loss or axon damage among patients at the start of the disease; thence, the m.c.v. values obtained with the conventional techniques will be related only with the amount of largest motor axons left undamaged, but will not give any information concerning the eventual dysfunctional state of those others with smaller diameters which could well be responsi-

ble for the muscle weakness and atrophy. Therefore, it becomes possible that, in a given subject, the most affected axons were those of smaller diameter and slower conduction velocity; consequently, the m.u. inervated by these axons will become non-functional, this situation bearing no relationship with the m.c.v. since this datum has been obtained by measuring the conduction velocity of the largest diameter and fastest conducting axons.

It is also difficult to interpret the results obtained when the number of m.u. were compared with the age of the patients. Although all the correlation coefficients had negative values, only those of the thenar and edb muscles belonging to group I showed a very weak statistical significance. A shallow interpretation of this finding would lead to the concept that there will not be any further loss of m.u. or, at most, that this loss will only be mild. However, this interpretation would be at variance with the well known clinical feature of progressive weakness and muscle atrophy which do occur in these patients. A more suitable explanation for this finding might be that the severity of denervation is different for each patient, so that every patient would have his or her individual level of compromise which would result in a light, moderate or severe loss of functional m.u. at the start of the disease and, thence, the particular time-course of the denervation as well as its clinical counterpart, weakness and muscle atrophy, would be related to the original number of m.u. Thus, patients with a reasonable number of m.u. at the beginning of the disease will remain active and not disable for a longer period than those with fewer m.u. at the starting point. If this is true, they constitute a heterogeneous group in terms of degree of muscle denervation and, therefore, any comparison between level of denervation and age will be meaningless. Here again, the only way of obtaining a satisfactory response would be to make, throughout several years, a longitudinal study. Unfortunately, we have had not such chance. However, this has been done by McComas et al [13] in five patients: they found a progressive loss of functional m.u. in different trials repeated on two or more occasions within two years.

The final aspect of this investigation concerns the behaviour of the remaining m.u. in terms of their ability to compensate the denervation. In figure 3, it can be seen that in the same subject, large and small size m.u. can coexist. This is mainly remarkable in patients with severe loss of operative m.u. Likely, this situation is due to the presence within the motoneuronal pool of these muscles of neurones in different stages of sickness, being those with m.u. of small size the most affected ones and, consequently, unable to adopt denervated muscle fibres, while those others with large m.u. territories represent healthy neurones able to sprout their axons and adopt previously denervated muscle fibres [6, 12]. The proportion between these two types of m.u. most probably, was the source of the behaviour of the linear regression lines and, consequently, of the significance of Pearson's coefficients when the numbers of the remaining m.u. were compared with their sizes. In the same figure it can be seen that the tendency for the compensation of the denervation by means of the enlargement of the remaining m.u. territories was much more pronounced in muscles of the upper limbs, mainly in the thenar group. This behaviour could be due to differences in the time-course of the disease for different muscles (and, consequently, different motoneuronal pools); thus, muscles in the legs and feet are predominantly, and very early affected in most of the patients, while the involvement of the hand muscles appears much later and with mild intensity.

Summary

An electrophysiological study has been made of the thenar, hypothenar, extensor digitorum brevis and soleus muscles and their motor innervation in 22 patients with Peroneal Muscular Atrophy. On median nerve maximal motor conduction velocity bases two groups of patients could be distinguished; one of them with

normal or slightly reduced values and the other with marked impairment. A significant reduction in the number of functioning motor units was found in both groups which was neither related to the age of the patients nor to the slowness of motor nerve conduction velocity. The capacity of the surviving axons to undertake collateral reinnervation was maintained in muscles of the upper limbs, but impaired in those of the lower limbs. The findings suggest that Peroneal Muscular Atrophy is a heterogeneous disease in terms of the degree of denervation among the affected individuals.

Resumen

ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN LA ATROFIA MUSCULAR PERONEA

Veinte y dos pacientes con Atrofia Muscular Peronea fueron sometidos a estudio electrofisiológico. El número de unidades motoras funcionantes fue estimado en los músculos de las eminencias tenar e hipotenar, en el extensor corto de los dedos y en el soleo. La velocidad de conducción nerviosa motora y sensitiva fue medida en nervios de miembros superiores e inferiores. En base a los valores de velocidad de conducción motora hallados en nervio mediano dos grupos de pacientes fueron individualizados: uno de ellos con marcada reducción de esos valores y el restante con cifras normales o muy discretamente disminuidas. Una significativa pérdida de unidades motoras fue hallada en ambos grupos y no estuvo correlacionada con la edad de los pacientes, así como tampoco con la velocidad de conducción motora hallada. La capacidad de colateralización de los axones sobrevivientes se mantuvo en miembros superiores, pero no en inferiores. Estos hallazgos sugieren que la atrofia muscular peronea es una enfermedad heterogénea en términos del grado de denervación que puede afectar a distintos individuos que padecen la misma entidad patológica.

References

1. Aguayo A, Perkins S, Duncan I, Bray G: Human and animal neuropathies studied in experimental nerve transplants. *In:* Peripheral Neuropathies. Proc. Intern. Symp. on Peripheral Neuropathies. N Canal, G Pozza (eds), Milán, 1978, p. 37.
2. Behse F, Buchtal F: Peroneal muscular atrophy (PMA) and related disorders. II Histological findings in sural nerves. *Brain* 100: 67, 1977.
3. Bradley WG: The nosology of peroneal amyotrophies: clinical electrophysiological and pathological aspects. *In:* Peroneal atrophies and related disorders. Proc. 4th Intern. Meeting on Neuromuscular Diseases. G Serratrice, H Roux (eds), Marseilles, 1976, p. 3.
4. Buchtal F, Behse F: Peroneal muscular atrophy (PMA) and related disorders. I Clinical manifestations as related with biopsy findings, nerve conduction and electromyography. *Brain* 100: 41, 1977.
5. Campbell MJ, Mc Comas AJ, Petito F: Physiological changes in ageing muscles. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 36: 174, 1973.
6. Coers C, Telerman-Toppet N: Changes in motor unit pattern in Charcot-Marie-Tooth disease as compared to Amyotrophic Lateral Sclerosis. *In:* Peroneal atrophies and related disorders. Proc. 4th Intern. Meeting on Neuromuscular Diseases. G Serratrice, H Roux (eds), Marseilles, 1976, p. 127.
7. Davis CJF, Bradley WG, Madrid R: The peroneal muscular atrophy syndrome. Clinical, genetic and electrophysiological findings and classification. *J Genet Hum* 26: 311, 1978.
8. Dick PJ, Lambert EH: Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. I Neurologic, genetic and electrophysiologic findings in hereditary polineuropathies. *Arch Neurol* 18: 603, 1968.
9. Dick PJ, Lambert EH: Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. II. Neurologic, genetic and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Arch Neurol* 18: 619, 1968.
10. Low PA, Mc Leod JG, Prineas JW: Hypertrophic Charcot-Marie-Tooth disease. Light and electron microscope studies of the sural nerve. *J Neurol Sci* 35: 93, 1978.
11. McComas AJ, Fawcett P, Campbell MJ, Sica REP: Electrophysiological estimation of the number of motor units within a human muscle. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 34: 121, 1971.
12. McComas AJ, Sica REP, Campbell MJ, Upton ARM: Functional compensation in partially denervated muscles. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 34: 453, 1971.
13. McComas AJ, Upton ARM, Toyanaga K, de Faria C, Delbeke J: Estimation of motor

unit numbers: Application to peroneal atrophy. *In:* Peroneal atrophies and related disorders. Proc. 4th Intern. Meeting on Neuromuscular Diseases. G. Serratrice, H Roux (eds), Marseilles, 1976, p. 175.

14. Pinelli P, Cosi V, Poloni M: EMG longitudinal studies in peroneal muscular atrophy: Different findings in hypomyelination and neuronal degeneration. *In:* Peroneal atrophies and related disorders. Proc. 4th Intern. Meeting on Neuromuscular Diseases. G. Serratrice, H Roux (eds), Marseilles, 1976 p. 153.
15. Salisachs P: Wide spectrum of motor conduction velocity in Charcot-Marie-Tooth disease. An anatomic-physiological interpretation. *J Neurol Sci* 23: 25, 1974.
16. Sica REP, McComas AJ, Upton ARM, Longmire D: Estimations of motor units in small muscles of the hand. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 37: 55, 1974.
17. Sica REP, Sanz Olga Paulina, Colombi A: The effects of ageing upon the human soleus muscle. An electrophysiological study. *Medicina (Bs Aires)* 36: 443, 1976.
18. Thomas PK, Calne DB, Stewart G: Hereditary motor and sensory polineuropathy (Peroneal Muscular Atrophy). *Ann Hum Genet* 38: 111, 1974.
19. Thomas PK, Harding AE: The clinical spectrum of peroneal muscular atrophy. *In:* Peroneal atrophies and related disorders. Proc. 4th Intern. Meeting on Neuromuscular Diseases. G. Serratrice, H Roux (eds), Marseilles, 1976, p. 17.

— — — —

I oppose and utterly repudiate the view that science is a great compendium of "facts" and that the scientist is essentially a fact gatherer — a man who cranks a machine of discovery. What unites us all in science and medicine is the characteristic that we are all in our several ways seekers after truth.

Me opongo y rechazo completamente la idea de la ciencia como un gran compendio de "hechos" y del investigador como de un recolector de datos — un hombre que hace funcionar una máquina de descubrimientos. Lo que nos une a todos en ciencia y en medicina es la característica de que todos, a nuestra manera, estamos en busca de la verdad.

PETER MEDAWAR

Perspectives in Biology and Medicine, 1975

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 309-320 (1981)

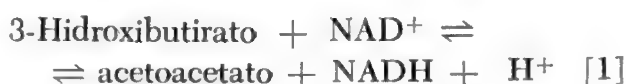
ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN EL MIOCARDIO DE RATAS DIABETICAS

LEA GRINBLAT, L. F. PACHECO [**], A. O. M. STOPPANI [***]

Instituto de Química Biológica y Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La diabetes es una enfermedad metabólica compleja, cuya causa más común es la deficiencia de insulina. Se acepta que la alteración bioquímica principal es la disminución del transporte de D-glucosa a través de las membranas celulares (en particular del músculo esquelético y del tejido adiposo) dependiente de la interacción de la insulina con receptores hormonales específicos. La disminución del transporte limita la utilización de la D-glucosa como fuente de energía celular, lo que crea la necesidad de otras fuentes, a saber, la oxidación de ácidos grasos, del acetil-CoA y del esqueleto carbonado de los aminoácidos. La producción excesiva de acetil-CoA lleva a la formación de "cuerpos cetónicos" (acetoacetato, 3-hidroxibutirato y acetona), cuya acumulación en la sangre y los tejidos produce la cetosis. La oxidación de los ácidos grasos y del acetil-CoA se realiza en las mitocondrias, de manera que el funcionamiento normal del sistema respiratorio mitocondrial tiene importancia vital para el organismo diabético.

La mayor parte de los estudios sobre mitocondrias diabéticas se han realizado con mitocondrias de hígado [5, 16-18, 25, 26, 32, 34, 38-40]. Roldán y col. [34] y Vidal y col. [39, 40] demostraron que en la diabetes disminuye la actividad de la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa (HBD) hepática, la enzima que cataliza la Reacción [1]



$$\text{3-Hidroxibutirato} + NAD^{+} \rightleftharpoons \text{acetoacetato} + NADH + H^{+} \quad [1]$$

La HBD (E.C. 1.1.1.30) es una enzima exclusivamente mitocondrial, inserta en la membrana interna. Teniendo en cuenta esos antecedentes, en el presente estudio hemos analizado las alteraciones del condrioma del miocardio de ratas diabéticas por inyección del antibiótico estreptozotocina (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitroso urea)-1-α-glucofuranosa ($\alpha + \beta$)). Son escasos los estudios realizados sobre la respiración del músculo diabético, debiéndose mencionar los de Dow [8] y Favelukes y col. [10] con mitocondrias de músculo esquelético, y las de Haugaard y Haugaard [19] con miocardio homogenado.

Recibido: 6-II-1981. Aceptado: 25-III-1981.

* Trabajo presentado en la XXV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mendoza, noviembre, 1980.

** Becario del Programa Multinacional de Bioquímica de la OEA (Organización de Estados Americanos).

*** Miembro de la Carrera del Investigador Científico, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Dirección postal: Instituto de Química Biológica, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina.

Material y métodos

Ratas. Se utilizaron ratas macho, cepa Williams del Instituto de Química Biológica (180-220 g de peso). Los animales tenían libre acceso a agua y alimento comercial Forramez o Purina. La diabetes se indujo por inyección intravenosa de estreptozotocina (65 mg/kg, única dosis) disuelta en citrato 0.1 M, pH 4.5, preparada en el momento y utilizada dentro de los 3 a 5 minutos. Las ratas testigos recibieron el mismo volumen de solución de citrato. Las ratas se utilizaron a los 30 días de diabetes confirmada, excepto cuando se indica de otra manera.

Mitocondrias. Se prepararon aplicando al miocardio el método de Favelukes y col.[9] para músculo esquelético, excepto la filtración del homogenado que no fue necesaria, y el número de lavados con el medio de Chappel-Perry adicionado con albúmina, que en algunos experimentos se redujo a dos.

Rotura de mitocondrias. 1) *Congelamiento-descongelamiento.* La suspensión mitocondrial en sacarosa 0.25 M se mantuvo a –20° hasta congelación, y luego a 4° en baño de hielo, hasta fusión total. El ciclo se repitió el número de veces que se indica en cada caso. 2) *Desintegración por ultrasonido.* Se realizó según Beyer[4]. La suspensión mitocondrial se irradió en desintegrador MSE (Measuring and Scientific Equipment) de 500 W, a 20 kc/segundos y 0.4-0.5 mA durante 1 minuto, fraccionado en períodos de 10 segundos. Durante la desintegración, las muestras se mantuvieron a 0-4° en baño de hielo. 3) *Tratamiento hipotónico.* Se realizó según Parsons y Williams[33] suspendiendo las mitocondrias en fosfato 20 mM, pH 7.5, con 0.02 g/100 ml de albúmina bovina. Después de 20 minutos a 4° se centrifugó la suspensión a 35 000/g, a 4°, durante 20 minutos y el sedimento se suspendió en fosfato 0.1 M, pH 7.5.

Respiración mitocondrial. El consumo de oxígeno se midió con un oxígrafo (Gilson Medical Electronics, modelo K) provisto de un electrodo vibratorio de platino. El medio de reacción contenía manitol 250 mM, ClK 10 mM, EDTA 2 mM, Tris-ClH 10 mM y fosfato 5 mM, pH 7.4; volumen final, 2.0 ml. El consumo de oxígeno se registró a partir de la adición de 0.1 ml de suspensión mitocondrial (2-3 mg de proteína). A continuación se agregó el sustrato oxidable (DL-3-hidroxibutirato 10 mM; o L-malato 5 mM, más L-glutamato 5 mM más malonato 2.5 mM), según se indica, y al cabo de 2-3 minutos, se agregó ADP 0.2-0.5 mM. Se midió la respiración hasta el agotamiento total de oxígeno del medio. Todas las medidas se hicieron a 30°. La Figura 4 muestra un trazado típico.

Actividad de la HBD. Se midió espectrofotométricamente a 340 nm por la velocidad de reducción del NAD^+. La mezcla de reacción contenía fracción mitocondrial (0.15-0.40 mg de proteína), Tris-ClH 50 mM, pH 8.0, NAD^+ 2.0 mM (excepto cuando se indica otro valor) y 0.3 μg de rotenona (para impedir la oxidación del NADH formado por la cadena respiratoria mitocondrial); volumen total, 1.0 ml. La velocidad de la reacción fue linealmente proporcional a la cantidad de proteína mitocondrial en el rango de 0.07-0.70 mg/ml. Se incubó durante 10 min en la celda del espectrofotómetro, colocada en el compartimiento correspondiente termostatizado a 30°. La reacción se inició agregando DL-3-hidroxibutirato (Na) 10 mM (concentración del isómero D). La variación de absorbancia se registró con la unidad fotométrica Gilford 2000 o en un espectrofotómetro Beckman DB-G acoplado a su registrador potenciométrico.

Métodos analíticos. La glucemia se determinó según Nikkila y Hyvarinen[31] y las proteínas mitocondriales según Jacobs y col.[21], agregando desoxicolato (concentración final, 0.2 g/100 ml).

Reactivos. Se utilizaron los siguientes: estreptozotocina, de Upjohn International Inc.; insulina NPH (de absorción lenta) de E. Lilly and Co.; Nagarse (BPN': 1.54 x 10^6 PUN/g), de Nagarse & Co. Ltd. Osaka; DL-3-hidroxibutirato (Na), NAD^+, Trizma, albúmina de bovino, sacarosa y manitol de Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. Los restantes reactivos fueron de pureza analítica.

Microscopía electrónica. Los sedimentos mitocondriales, resultantes de la centrifugación a 7 500/g[9], se fijaron en glutaraldehido y tetróxido de osmio; se incluyeron en resina Epon 812 y los cortes se trataron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se examinaron en un microscopio Siemens Elmiscop I.

Resultados

Acción diabetógena de la estreptozotocina. La estreptozotocina destruye selectivamente las células β de los islotes de Langerhans[1] como consecuencia de lo cual se produce una hiperglucemia fugaz seguida por una hipoglucemia transitoria (6-12 horas) que se convierte en una hiperglucemia permanente e intensa. Nuestros resultados fueron típicos pues la estreptozotocina produjo: *a)* hiperglucemia (Tabla 1); *b)* poliuria, polidpsia y polifagia; *c)* disminución del peso corporal; del peso del corazón (Tabla 1) y desaparición de tejido adiposo. Con algunas ratas, la investigación de la cetonuria dio resultado positivo durante la primera semana de diabetes (test de Ames) pero después, resultó siempre negativa. La inyección de insulina (40 UI/kg/día, durante dos días disminuyó la

TABLA 1. — *Efecto diabetogénico de la estreptozotozina* [1]

Ratas	Tiempo después de la inyección (días)	Parámetro metabólico		
		Glucemia (g/l)	Peso total (g)	Peso del corazón (g)
Testigos	—	1.03 ± 0.17 (17)	191 ± 12 (16)	0.59 ± 0.08 (30)
Inyectadas	3	3.28 ± 0.68 (38)	—	—
	7	—	—	0.46 ± 0.05 (18)
	20	4.25 ± 0.75 (15)	—	—
	28	—	169 ± 10 (6)	0.49 ± 0.05 (16)

[1] Las condiciones experimentales se describen en el texto. Los valores representan el promedio ± D. E. Entre paréntesis, número de ratas.

glucemia a valores iguales o menores que los normales.

Aislamiento de las mitocondrias de miocardio. El aislamiento de las mitocondrias de miocardio presenta dificultades especiales pues, como en el caso de las mitocondrias de músculo esquelético, es necesario separar las miofibrillas. Esa dificultad se resolvió añadiendo una proteasa (Nagarse) al medio de desintegración del tejido, como paso previo a la centrifugación diferencial del homogenado. De los métodos ensayados [9, 37], el de Favelukes y col. [9] resultó el mejor porque dio mitocondrias con el más alto control de la respiración por ADP (C.R. = 6.4 ± 0.23; P:O = 2.9 ± 0.10; 7 muestras con L-malato más L-glutamato como sustrato). La figura 1 muestra la microscopía electrónica de una preparación diabética. Se pueden ver mitocondrias de diversos tamaños y formas, con membranas bien constituidas y abundancia de crestas. Imágenes similares se obtuvieron con las mitocondrias normales.

Disminución de la actividad de la HBD. De acuerdo con los resultados previos con mitocondrias de hígado [34, 39, 40], la actividad de la HBD de miocardio disminuyó

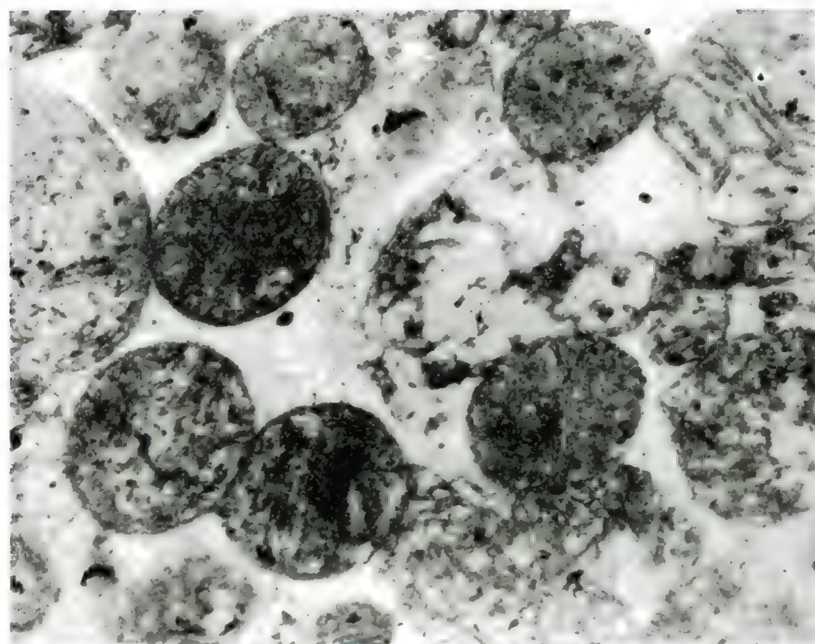


Fig. 1. — Mitocondrias de miocardio de ratas diabéticas después de 30 días de inyectar la estreptozotocina. Condiciones experimentales según Material y métodos x 10 000.

TABLA 2. — *Actividad de la HBD en mitocondrias normales y diabéticas* [1]

L-Cisteína (mM)	Actividad enzimática (nmol NAD+/min/mg proteína)		Disminución de la actividad (%)
	Normales	Diabéticas	
0	50.1 ± 3.3 [2]	25.9 ± 1.9	48
50	48.7 ± 5.1	24.2 ± 1.7	50

[1] La mezcla de reacción contenía proteína mitocondrial (0.4 mg/ml; 3-hidroxibutirato (Na), 10 mM; NAD+, 1.0 mM; rotenona, 0.3 μg; Tris-HCl, 50 mM; pH 8.0. Temp. 30º. La L-cisteína se añadió disuelta en Tris-HCl, a pH 8. Mitocondrias provenientes de ratas normales o diabéticas, rotas por congelamiento (5 ciclos). Otras condiciones experimentales según Material y métodos; [2] Promedio ± D. E. de 8 ratas. Diferencia entre normales y diabéticas: $p < 0.001$.

en forma significativa en las mitocondrias cardíacas de las ratas diabéticas (Tabla 2). La disminución de la actividad no fue corregida por la adición de cisteína, un activador específico de la HBD [15, 23]. La disminución de la HBD fue un fenómeno lento, comparado con otras manifestaciones de la diabetes, por ejemplo, la hiperglucemia. En efecto, durante la primera semana de diabetes, la actividad de la HBD varió en forma irregular encontrándose aumentada en algunas ratas y disminuida en otras. A partir de ese momento, la disminución se hizo evidente en todas las ratas alcanzando a los 30 días valores homogéneos en todas las ratas inyectadas con estreptozotocina. En contraste con la variación de la HBD, otras enzimas insertas en la membrana mitocondrial interna, a saber, la NADH-deshidrogenasa, la succinato deshidrogenasa y la citocromo oxidasa conservaron su actividad normal (resultados inéditos). Tampoco los niveles de los citocromos mitocondriales variaron en forma significativa (resultados inéditos), lo que permitió excluir una lesión general, no específica de la membrana mitocondrial interna.

La disminución de actividad de la HBD en las mitocondrias diabéticas rotas por congelamiento (Tabla 2) se confirmó con mitocondrias rotas por tratamiento con medio hipotónico o por desintegración ultrasónica. Es oportuno señalar que la rotura de la membrana mitocondrial interna es un paso indispensable para medir la actividad de la HBD pues en su ubicación normal, la enzima es inaccesible al NAD^+ (o NADH) extramitocondrial. La Tabla 3 muestra los resultados con las tres diferentes preparaciones. En todos los casos, la actividad de la HBD diabética fue menor que la normal, aproximadamente en la misma proporción. Se nota que la actividad específica de las muestras testigo varió según el procedimiento usado para romper las mitocondrias, lo que se debe al diferente contenido en proteínas inactivas en cada preparación o a una deficiente permeabilización, en el caso de las mitocondrias

TABLA 3. — *Actividad de la HBD en mitocondrias rotas por diferentes métodos* [1]

Tratamiento	Actividad enzimática (nmol NAD+/min/mg proteína)		Disminución de la actividad (%)
	Mitocondrias normales	Mitocondrias diabéticas	
Hipotónico (2)	17.5 ± 0.5	6.7 ± 0.3	61
Congelamiento (11)	50.5 ± 2.7	24.9 ± 2.0 [2]	51
Ultrasonido (3)	65.2 ± 15.5	32.0 ± 13.1 [3]	51

[1] Los valores representan el promedio de determinaciones efectuadas con una misma muestra de mitocondrias, sometida a los tratamientos indicados; el número de muestras examinadas se indica entre paréntesis. Otras condiciones experimentales como en la Tabla 2; [2] $p < 0.001$; [3] $p < 0.1$.

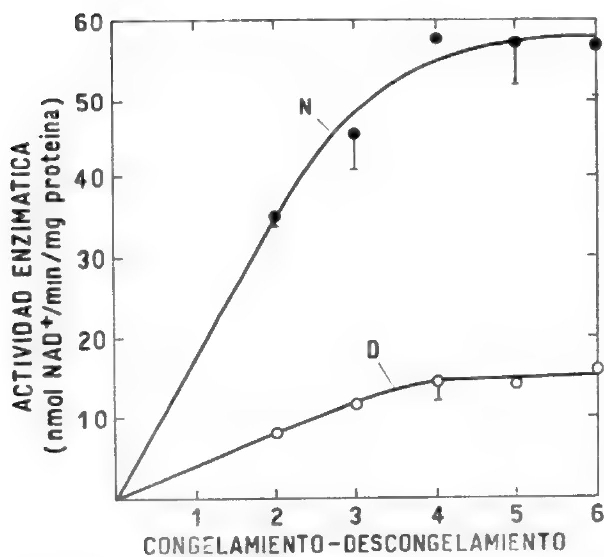
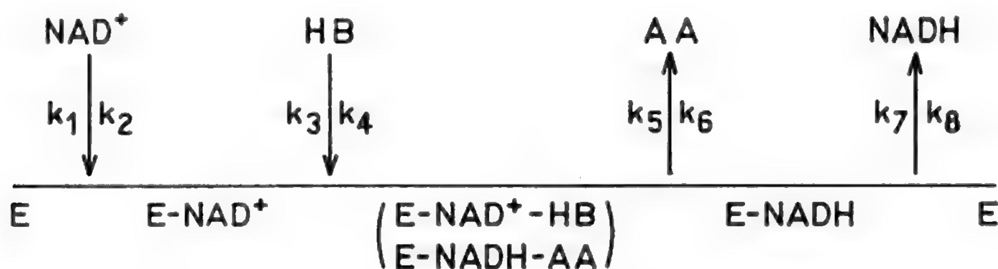


Fig. 2. — Actividad de la HBD en mitocondrias normales (N) y diabéticas (D) rotas por congelamiento-descongelamiento. La abscisa indica el número de ciclos. Condiciones experimentales según Material y métodos. Ratas diabéticas de 30 días. Promedio de dos muestras. Las barras verticales indican la desviación de los valores individuales respecto al promedio. Se muestran las desviaciones máximas.

sometidas a hipotonicidad. La mayor actividad específica se obtuvo con las mitocondrias sonicadas y en segundo término con las mitocondrias congeladas, siendo los valores similares a los obtenidos por Lehninger [24]. La actividad específica de las preparaciones resultantes de la desintegración ultrasónica varió en un rango relativamente amplio y por ello se prefirió el congelamiento para obtener muestras con actividad alta y constante y estabilidad prolongada, en forma rápida, sin necesidad de instrumentación especial.

La Figura 2 muestra que la actividad específica de la HBD aumentó en función del número de ciclos de congelamiento-descongelamiento, alcanzando su valor máximo después de 4 ciclos. La diferencia entre las actividades de la HBD normal y diabética se manifestó aun con muestras de baja actividad específica (Fig. 2) o insuficientemente permeabilizadas, en el caso del tratamiento hipotónico (Tabla 3). La variación del pH del medio de reacción entre pH 6.0 y 9.5 permitió confirmar la diferente actividad de la HBD en mitocondrias normales y diabéticas (resultados inéditos).

Variación de las constantes cinéticas de la HBD en mitocondrias diabéticas. La actividad de la HBD depende de la formación de complejos ternarios con el NAD^+ (o NADH) y el 3-hidroxibutirato (o acetoacetato) [30]. El mecanismo de la reacción se puede ver en la Figura 3 que muestra la formación de los complejos binarios E-NAD^+ y E-NADH; los complejos ternarios E-NAD^+-hidroxibutirato y E-NADH-acetoacetato y la sepa-



$$v = \frac{V[A][B]}{K_S^A K_M^B + K_M^B[A] + K_M^A[B] + [A][B]}$$

A, NAD^+; B, 3-HIDROXIBUTIRATO

Fig. 3. — Reacción de la HBD. En la Tabla 4 se muestra la equivalencia de los parámetros cinéticos. $V = \mathbf{V}_{max}$.

TABLA 4. — *Parámetros cinéticos de la HBD en mitocondrias normales y diabéticas* [1]

Parámetro cinético	Mitocondrias Normales (a)	Mitocondrias Diabéticas (b)	Variación (b/a)
V_{max} (μM NAD^+/min/mg proteína)	64.5	42.3	0.66(0.30) [2]
K_m^A (mM) = K_{NAD^+}	0.093	0.24	2.58(4.12)
K_s^A (mM) = K_{iNAD^+}	1.19	1.41	1.18(2.58)
K_m^B (mM) = K_{HOB}	0.55	0.36	0.65(1.02)

[1] Mitocondrias provenientes de 8 corazones de ratas testigo o de 12 corazones de ratas diabéticas. La actividad de cada muestra se midió en las condiciones normales, a concentración fija de 3-hidroxibutirato y concentración variable NAD^+ (entre 0.1 y 2.0 mM) o viceversa, a concentración fija de NAD^+ y concentración variable de 3-hidroxibutirato (entre 0.2 y 1.4 mM). Las actividades se midieron por duplicado siendo la dispersión $<$ 5 %. Otras condiciones experimentales como en la Tabla 2. El significado de los parámetros cinéticos se explica en la Figura 3; [2] Los valores entre paréntesis fueron calculados con actividades de HBD para mitocondrias de hígado, según Vidal y col. [40].

ración de los productos de la reacción en forma ordenada. Ese mecanismo determina constantes cinéticas que expresan en forma cuantitativa la capacidad de la enzima de unirse a los sustratos (NAD^+ y 3-hidroxibutirato) y los productos de reacción (NADH y acetoacetato). Las constantes son características de la HBD y su modificación en las mitocondrias diabéticas (Tabla 4) expresa la alteración de las propiedades catalíticas. Variaciones parecidas fueron observadas por Vidal y col. [40] con mitocondrias de hígado.

Efecto de la insulina sobre la actividad de la HBD. La inyección de insulina a ratas diabéticas de 30 días, durante períodos de 3 a 15 días normalizó la glucemia, pero el aumento de la actividad de la HBD fue pequeño, en el límite de significación (Tabla 5). El tratamiento con insulina de ratas normales, en las condiciones descriptas en la Tabla 5, no produjo variación significativa de la actividad de la HBD.

TABLA 5. — *Actividad de la HBD en mitocondrias diabéticas, después del tratamiento con insulina* [1]

Duración del tratamiento con insulina (días)	Actividad enzimática (nmol NAD^+/min/mg proteína)
0 (inicial)	21.4 ± 3.5 [2]
3	26.7 ± 2.9
7	25.0 ± 0.5
15	27.9 ± 3.1 [3]

[1] Mitocondrias de ratas diabéticas de 30 días, tratadas con insulina (40 UI/kg/día) el número de días que se indica. Otras condiciones experimentales como en la Tabla 2; [2] Promedio ± D.E. de 3 muestras de mitocondrias. Cada muestra representa 3 ratas; [3] $p < 0.05$.

Actividad respiratoria y fosforilante de las mitocondrias diabéticas. La Tabla 6 muestra que la velocidad de la respiración con 3-hidroxibutirato fue aproximadamente la mitad de la medida con L-malato más L-glutamato. La capacidad respiratoria y fosforilante de las mitocondrias diabéticas fue similar a las de las mitocondrias normales. Lo mismo ocurrió con L-glutamato más succinato como sustratos (observaciones inéditas). Tampoco se alteró la capacidad fosforilante de las mitocondrias diabéticas, como lo demuestran los valores de P:O y del control de la respiración por el aceptor de fosfato (relación entre la respiración activa (estado "3") y la respiración controlada (estado "4"). La Figura 4 muestra un trazado polarográfico típico obtenido con mitocondrias diabéticas y L-malato más L-glutamato como sustrato. Se puede ver que el efecto de la adición de ADP fue normal, en contraste con las

TABLA 6. — *Actividad respiratoria de mitocondrias normales y diabéticas* [1]

Mitocondrias	Consumo de oxígeno (ng átomo/mg de proteína) Estado "3" (a)	Estado "4" (a/b)	Control respiratorio (b/a)	P:O
	Sustrato: 3-hidroxibutirato			
Normales (11)	39.1 ± 3.3 [2]	22.6 ± 2.2	1.7	——
Diabéticas (8)	39.5 ± 3.4	25.5 ± 1.4	1.5	——
	Sustrato: malato-glutamato			
Normales (6)	167 ± 25	43.1 ± 2.1	4.0	2.61 ± 0.41
Diabéticas (7)	142 ± 19 [3]	31.9 ± 2.6 [4]	4.5	2.61 ± 0.28

[1] Mitocondrias, 1.8 mg de proteína. La respiración en estado "3" se midió en presencia de ADP (0.4 mM) y la respiración en estado "4", después de agotado el ADP. Otras condiciones experimentales según la Figura 4 y Material y métodos. Ratas diabéticas de 30 días; [2] Promedio ± D.E. del número de ratas indicado entre paréntesis; [3] $p < 0.4$; [4] $p < 0.01$.

alteraciones observadas con mitocondrias de hígado por otros investigadores [16, 17, 26, 38].

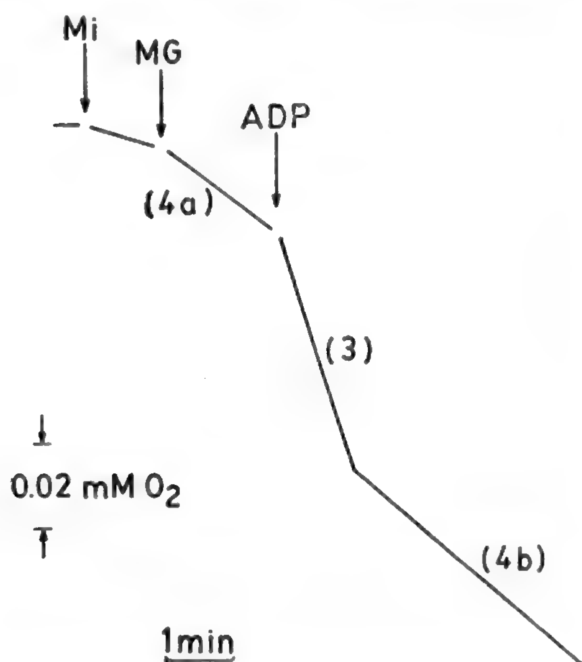


Fig. 4. — Control de la respiración por ADP en mitocondrias diabéticas. Determinación polarográfica del consumo de oxígeno. Mi, mitocondrias de ratas diabéticas de 7 días (0.5 mg de proteína/ml); MG, L-malato 5 mM, más L-glutamato 5 mM, más malonato 2.5 mM; ADP, 0.48 mM. Temp. 30°. Otras condiciones experimentales según Material y métodos. Los números entre paréntesis indican los "estados" de respiración controlada (4 (**a** o **b**) y respiración activa (3). Trazados similares se obtuvieron con mitocondrias de ratas diabéticas de 30 días (los valores se muestran en la Tabla 6).

Discusión

Los cuerpos cetónicos constituyen un importante aporte de energía para el miocardio, que los utiliza como sustratos preferenciales, comparados con la glucosa. En ausencia de insulina el acetoacetato llega a contribuir con el 73-82 % a la respiración del corazón [43]. La concentración de 3-hidroxibutirato en sangre arterial supera la del acetoacetato, especialmente en la cetosis.

La Reacción [1] (oxidación del 3-hidroxibutirato) constituye el primer paso en el proceso de la oxidación de los cuerpos cetónicos en tejidos extrahepáticos. En las mitocondrias diabéticas la actividad de la HBD está disminuida (Tablas 2 y 3) y en consecuencia la capacidad mitocondrial para oxidar 3-hidroxibutirato, también debería disminuir [36]. Sin embargo, las mitocondrias diabéticas oxidan el 3-hidroxibutirato con igual velocidad que las normales, paradoja que indicaría la presencia de un "exceso" de HBD en la membrana mitocondrial interna. La hipótesis del "exceso" de HBD se hace verosímil si se compara la actividad específica de la HBD en la membrana mitocondrial (Tablas 2 y 3) con el consumo de 3-hidroxibutirato por las mitocondrias enteras (Tabla 6; cada átomo g de oxígeno equivale a un mol de 3-hidroxibutirato). Se obtiene una relación (en n moles de sustrato/mg de proteína) de 50 (membrana)/39(mitocondria) que confirma la redundancia de una fracción de la HBD. En caso que parte del oxígeno consumido por las mitocondrias correspondiera a oxidación del acetoacetato, la

proporción de HBD no utilizada en la respiración mitocondrial sería aun mayor. Se puede entonces concluir que la HBD no es el marcapaso en la oxidación del 3-hidroxibutirato por mitocondrias enteras. En los tejidos que consumen cuerpos cetónicos (como el miocardio) esa función corresponde a la succinil-CoA:3-oxoácido CoA transferasa [27], enzima que cataliza la Reacción [2].

Acetoacetato + succinil-CoA $\rightleftharpoons$
$\rightleftharpoons$ acetoacetil-CoA + succinato [2]

La actividad de la transferasa de corazón no está disminuida en la diabetes crónica [3, 42] lo que concuerda con la igual actividad respiratoria de las mitocondrias normales y diabéticas (Tabla 6).

La información existente sobre deficiencias respiratorias en mitocondrias de músculo diabético es contradictoria. Por una parte, las observaciones de Goranson y Erulkar [14], Haugaard y col. [20] y Haugaard y Haugaard [19], indican una disminución del transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa. En cambio, Dow [8], y Favelukes y col. [10], con mitocondrias aisladas en condiciones rigurosas, demostraron actividad respiratoria y fosforilante normal. Es posible que en los estudios de Haugaard y col. con homogenado de corazón [19] o diafragma de rata [20], ácidos grasos libres [26] o esterificados con CoA [25] presentes en esas preparaciones, inhibieran la respiración mitocondrial y la fosforilación oxidativa. Estudios de Harano y col. [17] y Matsubara y Tochino [26] con mitocondrias de hígado apoyan esta explicación. Por otra parte, las mitocondrias utilizadas por Favelukes y col. [9, 10] y en el presente estudio, fueron lavadas con albúmina, que tiene la propiedad de ligar y eliminar los ácidos grasos. En resumen, las mitocondrias de músculo diabético no muestran alteraciones intrínsecas en su función respiratoria y fosforilante, pero no se excluye que en la célula diabética, el incremento anormal de ácidos grasos sea causa de alteraciones mitocondriales.

La disminución de la actividad de la HBD en las mitocondrias diabéticas se puede atribuir, como en el caso de la HBD hepática [40], a una modificación de los fosfolípidos que constituyen la membrana mitocondrial interna. La proporción relativa de ácidos grasos insaturados y saturados en esos lípidos determina la conformación activa de las enzimas incluidas en la membrana [35]. La HBD es una enzima cuya actividad depende de la asociación con fosfatidil colina, o con mezclas de fosfatidil colina y otros fosfolípidos mitocondriales. Además, la presencia de ácidos grasos insaturados en la fosfatidil colina es esencial para la actividad enzimática [11-13, 15, 22, 40, 41]. El aumento del $K_m(NAD^+)$ (Tabla 4), que también se observa con la HBD de hígado [40], concuerda con la hipótesis de la alteración de los fosfolípidos [25, 40], pues éstos son necesarios para la unión apoproteína - NAD^+ [12]. En la diabetes disminuye la proporción de ácidos grasos insaturados [25, 40], debido a la menor actividad de Δ9-desaturasa [29], y también disminuye el contenido de fosfatidil colina y de fosfatidil etanolamina en el miocardio [7]. La modificación de los fosfolípidos sería entonces la causa de la menor actividad de la HBD "diabética". Sin embargo, no se puede descartar *a priori* una disminución de la apoproteína en la membrana interna (esta posibilidad será analizada en otra publicación).

La menor actividad de la HBD en la diabetes contrasta con la actividad normal de otras enzimas mitocondriales, a saber, la citocromo oxidasa, la succinato deshidrogenasa y la NADH-deshidrogenasa. Dado que todas las enzimas dependen de fosfolípidos, cabe preguntar por qué la HBD muestra un comportamiento singular. La explicación siguiente responde a este interrogante. En el caso de las

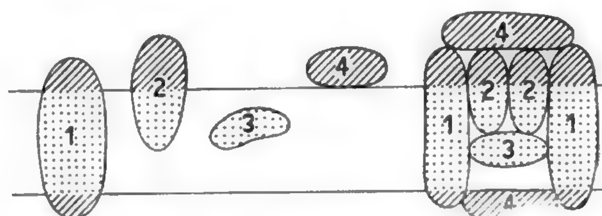


Fig. 5. — Representación de formas de orientación de proteínas respecto a la membrana mitocondrial interna: 1) disposición transmembrana (ej: citocromo oxidasa); 2) inserción parcial (ej: HBD); 3) proteína intrínseca; 4) proteína asociada. El complejo a la derecha incluye subunidades que pueden equipararse a los tipos anteriores (diagrama inspirado en McIntyre y col. [28]).

enzimas que constituyen complejos lipoproteicos, la activación depende, por una parte, de la solubilización de la enzima en la fase hidrofóbica del sistema (formada por ácidos grasos de cadena larga) y por la otra, de la unión específica de la enzima con la cabeza polar del fosfolípido. El grado de afinidad por la cabeza polar y por los residuos hidrofóbicos varía de una a otra enzima, de acuerdo a la secuencia de aminoácidos en los sitios de interacción. Esta diferencia se refleja en el grado de penetración de la proteína en la doble capa [28] que, como muestra la Figura 5, es distinta para la HBD respecto a las otras enzimas. En consecuencia, el grado de plasticidad de la membrana interna [35], que depende de su composición en ácidos grasos, pueden afectar de diferente manera la conformación y actividad catalítica de cada una de las enzimas asociadas a la misma.

La disminución de la actividad de la HBD es un proceso lento (Tabla 5), en contraste con otras alteraciones características de la deficiencia de insulina, que se manifiestan en pocas horas [27]. Viceversa, la insulina restablece lentamente y en forma parcial la actividad de la HBD del miocardio. Esto significa que el mecanismo hormonal que de alguna manera controla la actividad de la HBD es distinto del involucrado en la regulación del metabolismo de la glucosa. Es interesante el paralelismo de las variaciones de la HBD y de la succinil-CoA:3-oxoácido CoA transferasa de músculo esquelético [3].

Nuestros experimentos demuestran que después de una diabetes intensa y prolongada, la única alteración significativa en la membrana mitocondrial interna es la disminución de la actividad de la HBD. Cabría entonces suponer que esa disminución es una "lesión" puramente bioquímica sin trascendencia fisiológica. Sin embargo, dado que la HBD es un sensor del estado de la membrana mitocondrial interna, el defecto de la HBD podría atestiguar una lesión mucho más extensa que la simple disminución de su actividad.

Resumen

Se investigaron diferentes parámetros bioquímicos de las mitocondrias de miocardio de ratas diabéticas por inyección de estreptozotocina (65 mg/kg; única inyección; glucemias superiores a 3.0 g/l a las 48 h). Después de 30 días de diabetes hubo una disminución significativa (aproximadamente 50 %) de la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa mitocondrial, demostrable con mitocondrias rotas con 3 procedimientos diferentes (congelamiento-descongelamiento; desintegración ultrasónica y tratamiento hipotónico). Los parámetros cinéticos de la reacción se modificaron con la diabetes pues disminuyó el valor de V_{max} *y* K_m *(3-hidroxibutirato) y aumentó el* K_m *(NAD^+). Las alteraciones se manifestaron después de someter las mitocondrias a más de 4 ciclos de congelamiento. La variación de la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa fue selectiva, pues no hubo cambios significativos de otras enzimas integrantes de la membrana mitocondrial interna (NADH-deshidrogenasa; succinato deshidrogenasa; citocromo oxidasa) o del contenido en citocromos* aa_3, b, c *y* c_1. *La disminución de la actividad enzimática fue independiente del pH del medio (entre pH 6.0 y 9.0) y aparentemente insensible al tratamiento de las ratas con insulina, aun después de 15 días de tratamiento con dosis capaces de restablecer la glucemia normal (40 UI/kg/día). No obstante la disminución de la actividad de la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa, la respiración mitocondrial con varios sustratos oxidables (3-hidroxibutirato; L-malato más L-glutamato) fue normal, tanto en la velocidad de consumo de oxígeno como en el control por ADP. Los valores de la relación entre la actividad respiratoria en estado "3" (respiración activa) y estado "4" (respiración controlada) y el cociente P : O fueron similares en las mitocondrias normales y diabéticas. La microscopía electrónica de las mitocondrias diabéticas no mostró alteraciones.*

Summary

ALTERATIONS IN HEART MITOCHONDRIA IN DIABETIC RATS.

Structural and biochemical alterations have been frequently reported to occur in rat liver mitochondria as a result of experimental diabetes. In order to establish the appearance of similar alterations in heart mitochondria, rats were injected with streptozotocin (2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosourea) 1-α-glycopryranose) (α, β); 65 mg/kg; single dosis) and the organelles were examined for the following parameters: electron transport and oxidative phosphorylation; activity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase (HBD), NADH-dehydrogenase, succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase; cytochromes content; ultrastructure. Two days after streptozotocin injection permanent hyperglycemia (< 3.0 g/l) was established. One month after the development of the diabetic condition, the most significant mitochondrial alteration was the decrease of HBD activity, measured after disruption of mitochondria, either by repeated freezing and thawing, ultrasonic disintegration or hypotonic treatment. Typical HBD values, measured with mitochondria subjected 4 times to freezing-thawing, were (in nmol NAD+ reduced/min/mg protein; mean value ± S.D.; in parenthesis number of rats): control rats, 50.5 ± 2.7 (11); diabetic rats, 24.9 ± 2.0 (12) (p < 0.001). The decrease of HBD activity was independent of the method used to disrupt the mitochondria, the addition of L-cysteine (50 mM) to the assay mixture, or variation of the medium pH between pHs 6 and 9.5. Kinetic parameters for HBD, were determined by measuring HBD activity as a function of NAD+ concentration (in the range 0.1-2.0 mM) at fixed D-3-hydroxibutyrate concentration, and also as a function of D-3-hydroxybutyrate concentration (in the range of 0.2-1.4 mM) at fixed NAD+ concentration. Comparison of kinetic parameters for control and diabetic mitochondria showed a decrease of V_{max} *and* K_m *(D-3-hydroxybutyrate) and an increase of* K_m *(NAD+) for the diabetic mitochondria. The decrease of HBD activity occurred slowly, as compared with the rapid onset of diabetes that followed streptozotocin injection and it slowly receded after treatment with insulin (NPH, 40 IU/kg/day; two weeks treatment). HBD alteration was highly selective because activities of the NADH-dehydrogenase, succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase, as well as content of cytochromes* aa_3, b, c *and* c_1 *did not reveal significant differences between control and diabetic mitochondria. At variance with observations by other workers, but in good agreement with those by D.S. Dow (Biochemistry 6: 3350 (1967)), investigation of respiratory activity, ADP control of respiration and P : O quotient using 5 mM D-3-hydroxybutyrate, or 5 mM L-malate, 5 mM L-glutamate (plus 2.5 mM malonate) as oxidizible substrates, did not show significant differences between control and diabetic mitochondria, as indicated by the following values (in ng atom oxygen consumed/min/mg mitochondria; mean value ± S.D.; in parenthesis number of rats): state "3" ADP-activated respiration; L-malate-L-glutamate as substrate, 167 ± 25 (6) (control rats) and 142 ± 19 (7) (diabetic rats); p < 0.4 (not-significant); relationship between the rate of the ADP activated (State "3") respiration and the rate of the controlled (State "4") respiration, 4.0 (control rats) and 4.5 (diabetic rats); P : O quotient, 2.61 ± 0.41 (control rats) and 2.61 ± 0.28 (diabetic rats). Values for the state "3" respiration using 3-hydroxybutyrate as substrate were: 39.1 ± 3.3 (11) (control rats) and 39.5 ± 3.4 (8) (diabetic rats). Ultrastructural alterations could not be detected by electron microscopy in the diabetic mitochondria.*

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado con subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); la Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología (SECYT) y la Oficina de Investigaciones Científicas de la Organización de Estados Americanos (OEA), Programa Multinacional de Bioquímica. Se agradece a Upjohn International Inc., Kalamazoo, Michigan, la donación de estreptozotocina.

Bibliografía

1. Agarwal MK: Streptozotocin: mechanism of action. *FEBS Lett* 120: 1, 1980.
2. Bassenge E, Wendt VE, Schollmeyer P, Blumchen G, Gudbjarnason S, Bing RJ: Ef-

fect of ketone bodies on cardiac metabolism. *Am J Physiol* 208: 162, 1965.
3. Bassler KH, Ackermann RH, Wagner K, Schonerstedt B: Enzymatic changes associated with ketosis in long standing diabetes an prolonged starvation of rats. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 354: 48, 1973.
4. Beyer RE: Preparation, properties, and conditions for assay of phosphorylating electron transport particles (ETPH) and its variations. *Methods Enzymol* 10: 186, 1967.
5. Boveris AA, Cattaneo de Peralta Ramos M, Stoppani AOM, Foglia VG: Phosphorylation, oxidation, and ubiquinone content in diabetic mitochondria. *Proc Soc Exp Biol Med* 132: 171, 1969.
6. Campbell AK, Hales CN: Some aspects of intercellular regulation. *In:* The Cell in Medical Science. Cellular Control Mechanisms. (Beck F, Lloyd JB eds), vol 4, p 105, Academic Press, New York, 1976.
7. Chauhan UPS, Singh VN: Myocardial phospholipid metabolism in alloxan diabetic rats. *Life Sci* 22: 1771, 1978.
8. Dow DS: The isolation from thyrotoxic and diabetic rats of skeletal muscle mitochondria showing tight coupling, high respiratory indices, and normal adenosine triphosphatase activities. *Biochemistry* 6: 3350, 1967.
9. Favelukes SS de, Tarlovsky MS de, Stoppani AOM: Incorporation of amino acids by isolated rat liver and skeletal muscle mitochondria. *Acta Physiol Latinoam* 21: 30, 1971.
10. Favelukes SS de, Tarlovsky MS de, Bedetti CD, Stoppani AOM: Hormonal effects on mitochondrial protein synthesis. *In:* Gene Expression and its Regulation. (Kenney FT, Hamkalo BA, Favelukes G, August JT eds), vol 1, p 539, Plenum Press, New York, London, 1973.
11. Fleischer S, Bock HG, Gazzotti P: Studies of phospholipid-protein interaction in D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase, a lecithin requiring enzyme. *In:* Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation. (Azzone GF, Klingenberg ME, Quagliariello E, Siliprandi N eds), p 125, North-Holland Publ Co, Amsterdam, 1974.
12. Gazzotti P, Bock HG, Fleischer S: Role of lecithin in D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase function. *Biochem Biophys Res Commun* 58: 309, 1974.
13. Gazzotti P, Bock HG, Fleischer S: Interaction of D-β-hydroxybutyrate apodehydrogenase with phospholipids. *J Biol Chem* 250: 5782, 1975.
14. Goranson ES, Erulkar SD: Effect of insulin on aerobic phosphorylation of creatine in tissues from alloxan-diabetic rats. *Arch Biochem* 24: 40, 1949.
15. Gotterer GS: Rat liver D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase. II. Lipid requirement. *Biochemistry* 6: 2147, 1967.
16. Hall JC, Sordahl LA, Stefko PL: The effect of insulin on oxidative phosphorylation in normal and diabetic mitochondria. *J Biol Chem* 235: 1536, 1960.
17. Harano Y, DePalma RG, Lavine L, Miller M: Fatty acid oxidation, oxidative phosphorylation and ultrastructure of mitochondria in the diabetic rat liver. *Diabetes* 21: 257, 1972.
18. Harano Y, DePalma RG, Miller M: Fatty acid oxidation, citric acid cycle ativity, and morphology of mitochondria in diabetic rat liver. *Proc Soc Exp Biol Med* 131: 913, 1969.
19. Haugaard ES, Haugaard N: Diabetic metabolism. I. Carbohydrate utilization and high energy phosphate formation in heart homogenates from normal and alloxan-diabetic rats. *J Biol Chem* 239: 705, 1964.
20. Haugaard N, Marsh JB, Stadie WC: Phosphate metabolism of isolated rat diaphragm. *J Biol Chem* 189: 59, 1951.
21. Jacobs EE, Jacob M, Sanadi DR, Bradley LB: Uncoupling of oxidative phosphorylation by cadmium ion. *J Biol Chem* 223: 147, 1956.
22. Jurtshuk P, Sekuzu I, Green DE: Studies on the electron transfer system. LVI. On the formation of an active complex between the apo-D-(-)-β-hydroxybutyric dehydrogenase and micellar lecithin. *J Biol Chem* 238: 3595, 1963.
23. Latruffe N, Gaudemer Y: Propriétés et mécanisme cinétique de la D-(-)-β-hydroxybutyrique déshidrogénase de particules sous-mitochondriales de foie de rat. Effets comparés de différents agents thiols. *Biochimie* 56: 435, 1974.
24. Lehninger AL, Sudduth HC, Wise JB: D-β-hydroxybutyric deshydrogenase of mitochondria. *J Biol Chem* 235: 2450, 1960.
25. Lerner E, Shug AL, Elson C, Shrago E: Reversible inhibition of adenine nucleotide translocation by long chain fatty acyl coenzyme A esters in liver mitochondrial of diabetic and hibernating animals. *J Biol Chem* 247: 1513, 1972.
26. Matsubara T, Tochino C: Depression of respiratory activities in the liver mitochondria of diabetic rats and the restorative action of insulin. *J Biochem (Tokio)* 66: 397, 1969.
27. McGarry JD, Foster DW: Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Ann Rev Biochem* 49: 395, 1980.
28. McIntyre JO, Bock HGO, Fleischer S: The orientation of D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase in the mitochondrial inner membrane. *Biochem Biophys Acta* 513: 255, 1978.
29. Mercuri O, Peluffo RO, de Tomás ME: Effect of different diets on the 9-desaturase activity of normal and diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 369: 264, 1974.
30. Nielsen NC, Zahler WL, Fleischer S: Mitochondrial D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase. IV. Kinetic analysis of reaction mechanism. *J Biol Chem* 248: 2556, 1973.
31. Nikkila EA, Hyvarinen A: Specific determination of blood glucose with o-toluidine. *Clin Chim Acta* 7: 140, 1962.
32. Parks RE, Adler J, Copenhaver JH: The efficiency of oxidative phosphorylation in mitochondria from diabetic rats. *J Biol Chem* 214: 693, 1955.

33. Parsons DF, Williams GR: Isolation and purification of the outer membrane and inner membrane of liver mitochondria. *Methods Enzymol* 10: 443, 1967.
34. Roldán AG, del Castillo EJ, Boveris A, Garaza Pereira AM, Stoppani AOM: Decreased activity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase in diabetic liver mitochondria. *Proc Soc Exp Biol Med* 137: 791, 1971.
35. Sandermann H: Regulation of membrane enzymes by lipids. *Biochim Biophys Acta* 515: 209, 1978.
36. Schafer G, Nagel L: Action of insulin and triiodothyronine on energy-controlled pathways of hydrogen. *Biochim Biophys Acta* 162: 617, 1968.
37. Tyler DD, Gonze J: The preparation of heart mitochondria from laboratory animals. *Methods Enzymol* 10: 75, 1967.
38. Vester JW, Stadie WC: Studies of oxidative phosphorylation by hepatic mitochondria from the diabetic cat. *J Biol Chem* 227: 669, 1957.
39. Vidal JC, Guglielmucci EA. Stoppani AOM: Modulation of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase activity by membrane lipid. *Fed Proc* 36: 721, 1977.
40. Vidal JC, Guglielmucci EA, Stoppani AOM: 3-D-(-)-Hydroxybutyrate dehydrogenase from rat liver mitochondria. Purification and interaction with phospholipids. *In:* Advances in Experimental Medicine and Biology. (Bazan NG, Brenner RR, Giusto NM eds) vol 83, p 203, Plenum Press, New York, 1977.
41. Vidal JC, Guglielmucci EA, Stoppani AOM: Interaction of rat liver 3-D-(-)-hydroxybutyrate apodehydrogenase with phospholipids. *Arch Biochem Biophys* 187: 138, 1978.
42. Williamson DH, Bates MW, Page MA, Krebs FA: Activities of enzyme involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissues. *Biochem J* 121: 41, 1971.
43. Williamson JR, Krebs HA: Acetoacetate as fuel of respiration in the perfused rat heart. *Biochem J* 80: 540, 1961.

— — — —

When one questions the unknown, the answer is rarely found quickly. An observation is made, but its meaning and ultimate value are usually not obvious; the analysis of a new observation or a new set of phenomena may be complex, and to a certain extent success may be fortuitous. In pursuing an idea the scientist may start off in one direction, but an unforeseen finding or accidental observation may point the way along a diferrent path. Those who are lost in a dark forest, must use all their senses and all their ingenuity in seeking the clues that may lead them to the light.

Cuando se inquiere lo desconocido la respuesta rara vez es hallada rápidamente. Se hace una observación, pero su significado y valor final usualmente no son obvios; el análisis de una nueva observación o un nuevo conjunto de fenómenos puede ser complejo y, en cierta medida, el éxito puede ser fortuito. En persecución de una idea el científico puede partir en una dirección, pero un hallazgo imprevisto o una observación accidental pueden orientar la marcha a lo largo de un sendero diferente. Aquellos que están perdidos en el oscuro bosque deben usar todos sus sentidos y todo su ingenio en busca de indicios que los conduzcan hacia la luz.

MAXWELL M. WINTROBE

Blood, pure and eloquent: A story of discovery, of people and of ideas. McGraw-Hill, 1980

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 321-327 (1981)

RUNT DISEASE IN MICE AFTER PRETREATMENT OF THE MOTHER WITH TUMOR ANTIGENS *

MARTA MATUSEVICH **, ISABEL PIAZZON **, ADRIANA DEROCHE ***
CHRISTIANE DOSNE PASQUALINI ****

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

In accordance with the laws of transplantation, the fetus which is an allograft by definition, should be rejected by the mother. The fact is that not only does the fetus grow unhindered but that the mother is so well protected against immunological impacts that repeated gestations do not lead to immunological memory, all of which still constitutes one of Nature's mysteries. Even through it is extremely difficult to harm the fetus, under special experimental conditions, Beer and Billingham [2] working with inbred rat strains succeeded in inducing runt disease in the litters of mothers pretreated with syngeneic lymphocytes sensitized against paternal antigens. Furthermore, Milgrom et al. [11] induced fetal damage in rats by preimmunizing the mother with 4 successive skin grafts of paternal origin while a single skin graft had no deleterious effect. This experiment was confirmed in mice, in our laboratory [10]; furthermore, when skin grafts were replaced by tumor grafts of paternal origin, one subcutaneous challenge was enough to induce runt disease, the incidence of which was significantly increased by 4 successive transplants. The object of the present study was to investigate: 1) whether maternal immunization with a tumor of non-paternal origin can induce runting in the offspring, and 2) whether the extent of fetal damage is related to the route of administration of the tumor antigen, by comparing protocols conditioning for tumor enhancement with those leading to tumor rejection.

Material and methods

Mice. Inbred BALB and AKR mice, as well as outbred Swiss mice, raised in our colony, were used throughout. They were of both sexes and from 2 to 4 months old at the time of mating.

Tumors. The tumor of paternal origin consisted of an AKR lymphoma of spontaneous origin, maintained as a syngeneic subcutaneous cell line, designated L15; it was used as immunogen in BALB females subsequently mated with AKR males. Sarcoma 180 (S180) was chosen as tumor of non-paternal origin; it was obtained from the serial cell line maintained in BALB mice by subcutaneous passages: it is 100 % lethal in that strain with an average latency of 42 days. Because it has been passaged for many years and in many strains of mice, S 180 is regarded as an heterogeneous tumor, that is non-strain-specific. A subcutaneous challenge in Swiss mice yields a 23 % lethal tumor incidence with an average latency of 52 days. Swiss females received S180

— — — —

Received: 22-IV-1981. Accepted: 3-VI-1981.

* Presented at the International Congress of Immunology, Paris, July 1980.

** Fellow of CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

*** Fellow of FUNDALEU (Fundación para combatir la leucemia).

**** Member of Research Career of CONICET.

Postal address: Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Las Heras 3092, 1425 Buenos Aires, Argentina.

preparations and were subsequently mated with Swiss males.

Acellular tumor extracts. These were prepared by homogenizing about 200mg of either L15 or S180 in 10ml of physiological saline followed by sequential centrifugation at 1000 and 7000 g. Half of the supernatant was used as such, while the other half was processed as follows: an equal volume of acetone was added and after thorough mixing, the tubes were left at 4ºC for 1 h and then centrifuged at 100 g; the precipitate was dried to remove all traces of acetone and redissolved with saline to the original volume. Of the 4 preparations obtained, AE-L15, AE-L15-Ac, AE-S180, AE-S180-Ac, 0.2 ml i.p. were administered to female BALB and Swiss mice, respectively: 1) 10 days before challenge with the corresponding tumor, and 2) 4 days before they were mated to AKR and Swiss males, respectively.

Experimental tumor model. A model was devised in our laboratory according to which the inoculation of a tumor within a subcutaneously implanted glass cylinder conditioned for tumor enhancement [9, 12-17]. In brief, cylinders made of neutral glass tubing, 1 cm in diameter and 1.5cm in length, were implanted s.c. in female BALB and Swiss mice. Two days later, a solid fragment of either L15 or S180, containing about 10^6 cells, was loaded into a 15-gauge trocar which was introduced into the glass cylinder (GC) through the skin and discharged with 0.2ml of physiological saline. Lethal tumor incidence was compared in 4 groups of BALB or Swiss females: 1) pretreated with AE-L15-Ac, 10 days before L15 challenge within GC; 2) pretreated with AE-L15 or AE-S180, 10 days before L15 or S180 challenge within GC; 3) L15 or S180 challenge within GC; 4) L15 or S180 subcutaneous challenge. The last group served as rejection protocol while the others constituted enhancement protocols.

Graft versus Host (GvH) reaction. The local popliteal lymph node assay was carried out as described in a previous paper [16]. In brief, about 10^6 viable BALB splenocytes were inoculated into the right footpad of F1 (BALBxAKR) mice and both popliteal lymph nodes were removed 7 days later. The GvH reaction was expressed as the difference in weight between the 2 lymph nodes, in mg.

Maternal immunization. BALB females were mated with AKR males under different circumstances: 1) 4 days after an inoculation of AE-L15-Ac; 2) 4 days after AE-L15 administration; 3) 1 week after L15 challenge within GC: 4) 1 week after a subcutaneous challenge with L15. The control groups consisted of 5) untreated mice; 6) pretreated 1 week before mating, with 10^6 AKR splenocytes inoculated within GC; 7) a similar pretreatment with AKR splenocytes by subcutaneous route.

Swiss females were mated with Swiss males 4 days after similar pretreatment with 8) AE-S 180-Ac, 9) AE-S180, 10) S180 subcutaneously, 11) nothing.

Fetal damage and runting were evaluated by the number of offspring per litter at birth and the number of deaths before weaning at 30 days of life.

Results

The glass-cylinder model. This experimental model has been devised in order to permit the growth of a tumor in animals which reject a subcutaneous challenge, either completely, as is the case in allogeneic host-tumor combinations or in a high percentage, as observed with heterologous tumors such as S180. As can be seen in Table 1, this significant in-

TABLE 1. — *The glass-cylinder model used to compare tumor enhancement with rejection protocols*

Pretreatment *	Glass cylinder	+	Donor tumor	Lethal tumors n/total	%
			BALB host — AKR tumor (L15)		
AE - L15 - Ac **	GC	+	L15	26/34	76
AE - L15	GC	+	L15	13/35	37
	GC	+	L15	7/38	16
			L15 sc	0/36	0
			Swiss host — Sarcoma 180 (S180)		
AE - S180	GC	+	S180	36/ 38	95
	GC	+	S180	81/119	68
			S180 sc	11/ 48	23

* 10 days before tumor challenge within the glass-cylinder (GC).
** Acetone-treated acellular tumor extract.

TABLE 2. — *Induction of runt disease in the offspring of mothers pretreated with tumor associated antigens 4 days before mating. (Evaluated on the basis of number of offsprings at birth and mortality at weaning)*

Group	Pretreatment	Nº of mothers	Nº of offspring per mothers	Death at weaning n/total	Death at weaning %	p *	GvHR ** mg
			♀ *BALB* x ♂ *AKR*				
1	AE L15 - Ac ***	5	8.4	27/ 42	64	< 0.1	8.4
2	AE L15	7	8.3	27/ 58	46	< 0.025	8.6
3	(GC + L15)****	16	8.1	38/130	29	< 0.05	7.8
4	L15 sc	12	7.2	15/ 87	17	< 0.025	2.6
5	—	14	9.5	9/134	7		2.2
6	(GC + AKR spleen)	8	7.1	21/ 57	37	< 0.001	
7	AKR spleen sc	5	6.6	1/ 33	3		
			♀ *Swiss* x ♂ *Swiss*				
8	AE S180 - Ac ***	5	10.6	29/53	55	< 0.1	
9	AE S180	6	8.0	18/48	37	NS	
10	S180 sc	5	7.4	13/37	35	< 0.001	
11	—	6	11.6	6/70	8		

* calculated by X^2.
** Graft versus Host Reaction expressed as difference between popliteal lymph node weights in F1 (BALB x AKR).
*** acetone-treated acellular tumor extract.
**** tumor inoculation within the glass cylinder (GC).

crease in lethal tumor incidence can be further increased by pretreatment of the host, 10 days before tumor challenge, with acellular extracts of the specific tumor; moreover, acetone-treated extracts lead to maximum tumor incidence. In other words, this model permits a stepwise study of tumor growth, as a measure of tumor enhancement, as discussed in previous publications [9, 12-17]. These enhancement protocols can be contrasted with a rejection protocol consisting of a subcutaneous tumor challenge.

Induction of runt disease. As can be seen in Table 8, the number of offspring per litter was highest in the case of untreated mothers, averaging 9.5; however, the difference was not significant for any of the experimental groups, which ranged from 6.6 to 8.4. Runt disease was only observed after birth and can best be evaluated by the number of animals which died before weaning at 30 days after birth. Before death, the animals presented the classical signs of runt disease, such as furry hair, loss of weight and finally caquexia, splenomegaly of variable degrees and even splenic atrophy at the time of death. As can be seen in Table 2, in the BALB x AKR combination, pretreatment of the mother 4 days before mating, with L15 tumor preparations of paternal origin, led to a mortality rate directly proportional to the tumor enhancement protocol: the highest value (64 %) was observed in the group pretreated with AE-L15-Ac and the lowest value (17 %) in the group pretreated with a subcutaneous tumor challenge, which constitutes a rejection protocol. The difference between each group was statistically significant. The GvH reaction data carried out at the time of mating, that is, 4 days after pretreatment with the tumor antigen, are in accordance with the incidence of runt disease and confirm previous results [16] in that the highest values were obtained with the protocols favoring enhancement: the values of the first 3 groups are significantly different from the normal GvH reaction (Group 5) and from that of the rejection protocol (Group 4).

A further demonstration that the glass-cylinder-route increases the incidence of

runt disease is the significantly higher value (37 %) obtained in Group 6, when AKR splenocytes were inoculated within GC, as compared to Group 7, which received a similar subcutaneous inoculation (3 %); the latter did not differ from the control Group 5.

The pretreatment of Swiss females mated to Swiss males with S180 either by subcutaneous challenge (Group 10) or by inoculation of AE-S180-Ac or AE-S180 (Groups 8, 9) led to a high incidence of runting with a statistically higher value (55 %) for the acetone-treated extracts, that is, the protocol favoring maximum enhancement. In this case, there was no difference between Group 9 and 10, with a high runting incidence even with the rejection protocol. This may be due to the fact that not all Swiss mice reject S180 after subcutaneous challenge (Table 1).

Discussion

According to the laws of transplantation, an allogeneic graft, be it a tumor or a fetus, should be rejected. The concept of immunological surveillance implied that rejection of non-self was implemented by a T-cell response. Conversely, in the presence of immunological enhancement, tumor-host and materno-fetal relationships have often been compared [1, 3, 7, 15] and the successful tumor and fetal growth have been attributed to a failure of the rejection reaction or to an escape from immunological surveillance. As such this would imply a decreased T lymphocyte response. It was, therefore, unexpected to observe in the experiments reported herein that protocols leading to tumor enhancement led to an increase in T-cell response as evaluated by 1) a marked and early increase in the capacity to mount a graft versus host reaction, and 2) a proportionally high incidence of maternally-induced runt disease, when compared with protocols favoring tumor rejection. That the route of presentation of the tumor antigen is crucial was confirmed by the high incidence of runt disease observed in the offspring of mothers which had received normal splenocytes of paternal origin by the glass-cylinder-route (enhancement protocol) as compared with the absence of damage when the subcutaneous route was chosen (rejection protocol).

What is the mechanism responsible for fetal damage? Runt disease is by definition the outcome of a severe graft versus host reaction [5] and as such would be due to the cytotoxic effect of alloreactive maternal T lymphocytes *(graft)* which would gain access into the fetus *(host)* and attack *(versus)* its lymphoid system, in response to allogeneic (non-self) histocompatibility antigens. It is generally accepted that normally a number of maternal lymphocytes are present in fetal circulation and it is postulated that stimulated lymphocytes would cross the trophoblast barrier in even greater numbers [1, 3]. This could be the explanation of the fetal damage observed in our experiments since the capacity to mount a graft versus host reaction is directly related to the incidence of runt disease. However, it must be pointed out that the number of offspring born per litter is not significantly decreased as compared to normal controls, and that runting is apparent only after the first week of life. It may be that the T lymphocytes of the mother present in the fetus are prevented from inflicting damage by the immunological status which pervades during pregnancy and that only after birth can they exert their cytotoxic effect. The possibility is being investigated that their presence in milk is responsible for runting in the newborn, since it is known that milk may contain up to 10^6 lymphocytes per ml [4].

An important question raised by these experiments is the nature of the immunogen responsible for the maternally-induced runt disease. Either tumor cells or acellular tumor extracts were administered, but is the antigen tumor specific, tumor associated or simply nontumoral? It is clear from the results obtained that 1) the tumor of paternal origin can be replaced by splenocytes of the same origin, and 2) the tumor need not be of paternal origin. If the maternal alloreac-

tive T lymphocytes are the ones to react and eventually to damage the fetus, how are they stimulated to do so? Alloreactive T lymphocytes, that is, reactive against major histocompatibility antigens, are characterized by 1) their high frequency in normal, non-sensitized animals, and 2) their failure to increase in number after in vivo allostimulation [6, 18]. Therefore, the increase observed both in the graft versus host assay and in the incidence of runting would not be due to sensitization against major histocompatibility antigens, but could be due to 1) an alteration of the normal lymphoid traffic, 2) sensitization against minor histocompatibility antigens (H-1, H-3, etc.) and/or 3) clonal expansion of alloreactive T lymphocytes produced by hyperstimulation with conventional (non-histocompatibility) antigens. Many authors [6, 8] postulate that alloreactive T cells also possess receptors for conventional antigens, which in our case could include tumor-associated antigens.

It is even more difficult to explain why antigens presented by routes conditioning for immunological enhancement stimulate maternal T lymphocytes in a more "aggressive" way, as far as the induction of runt disease is concerned.

Whatever the explanation, it has been possible to obtain maternally-induced runt disease after immunization with both paternal and non-paternal tumors, with an incidence related to the mode of administration of the immunogen: routes favoring tumor enhancement yielded a higher incidence of runting than rejection protocols.

Summary

In a previous paper it was demonstrated that offspring of female mice immunized with a tumor of paternal origin develop runt disease [10]. The object of this report was to investigate whether a tumor of non-paternal origin could also be capable of inducing maternally acquired runt disease, and furthermore, whether the extent of fetal damage could be related to the mode of presentation of the tumor antigen; this was done by comparing protocols conditioning for tumor enhancement with those leading to tumor rejection. For this purpose, two experimental models were used: 1) female BALB mice immunized with an AKR lymphoma (L 15) before mating with AKR males; 2) female Swiss mice immunized with Sarcoma 180 (S 180) before mating with Swiss males. The rejection protocol consisted of a subcutaneous tumor challenge 1 week before mating. The enhancement protocols, on a decreasing scale, consisted of a) *acetone-treated acellular tumor extracts administered ip 4 days before mating;* b) *acellular tumor extracts similarly administered;* c) *a tumor challenge by the glass-cylinder-route [12-17] 1 week before mating. All litters were near normal in size but signs of runting began to appear shortly after birth, leading to death before weaning at day 30. Death incidence in the different groups was directly proportional to the degree of tumor enhancement obtainable with the corresponding protocols; that is, the highest values for death due to runting were obtained in the litters of mothers immunized with acetone-treated acellular extracts of L 15 (64 %) or of S 180 (55 %). The lowest values were registered in the offspring of mothers which had received a subcutaneous tumor challenge of either L 15 (17 %) or S 180 (35 %); both values, however, were significantly higher than those corresponding to untreated BALB (7 %) and Swiss (8 %) litters. These results indicate that tumor antigens are capable of causing maternally induced runt disease, even when unrelated to the paternal strain, and that a route of presentation of the antigen favoring immunological enhancement yields the highest incidence of runting. It is assumed that runt disease is caused by the penetration of stimulated maternal alloreactive T lymphocytes into the fetus causing a graft versus host reaction which leads to death. However, both the nature of the immunogen and the time sequence leading to runting remain to be determined.*

Resumen

Daño fetal en el ratón por pretatamiento de la madre con antígenos tumorales.

En un trabajo anterior se demostró en el ratón que la inmunización de la madre con un tumor de origen paterno podía dañar a su progenie [10]. *En este trabajo se investigó la posibilidad de conseguir el mismo efecto con un tumor que no era de origen paterno y, además, si el grado de daño podía ser relacionado con el modo de presentación del inmunógeno. Para esto se utilizaron protocolos que inducen exacerbación tumoral comparándolos con los que llevan al rechazo tumoral (Tabla 1). Se emplearon dos modelos experimentales: 1) hembras BALB inmunizadas con un linfoma AKR (L 15) antes de cruzarlas con machos AKR; 2) hembras Swiss inmunizadas con Sarcoma 180 (S 180) antes de cruzarlas con machos Swiss. El protocolo de rechazo consistió en un trasplante tumoral por vía subcutánea, 1 semana antes del cruzamiento. Los protocolos que llevan a exacerbación tumoral, en escala descendiente, son:* a) *la administración intraperitoneal de extractos acelulares de tumor tratados con acetona, 4 días antes del cruzamiento;* b) *lo mismo con extractos acelulares de tumor;* c) *inoculación del tumor por vía cilindro de vidrio* [12-17], *1 semana antes del cruzamiento. En todos los casos el número de crías fue casi normal; signos de* runting *aparecieron a los pocos días, es decir, pérdida progresiva de peso hasta llevar a la muerte antes del destete a los 30 días. La incidencia de muerte (Tabla 2) fue proporcionalmente más alta con los protocolos de exacerbación inmunológica; los valores más altos de* runting, *64 % de muertos con L 15 y 55 % con S 180, se obtuvieron en camadas de madres que habían recibido una inoculación de extractos acelulares del tumor tratados con acetona. En cambio, los valores más bajos, 17 % con L 15 y 35 % con S 180, se obtuvieron después de la inmunización de la madre con un trasplante tumoral subcutáneo; ambos valores, sin embargo, difieren significativamente de los registrados en camadas normales (7 % y 8 %, respectivamente). Estos resultados indican que antígenos tumorales, aun de origen no-paterno, son capaces de inducir daño en la progenie de madres inmunizadas y que la vía de presentación del antígeno que favorece la exacerbación inmunológica es la que causa mayor daño. Considerando que el* runting *se produciría por pasaje de linfocitos T estimulados de la madre al feto causándole daño por una reacción de injerto contra huésped, quedan por dilucidar, por un lado, la naturaleza del inmunógeno y, por el otro, la secuencia en el tiempo que conduce al daño de la progenie.*

Acknowledgment: This work was supported by grants from CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) and from FUNDALEU (Fundación para combatir la Leucemia). The continuous skilful technical assistance of Messrs Juan Portaluppi and Antonio Morales is gratefully acknowledged.

References

1. Beer AE, Billingham RE: Materno-fetal interrelationship. *Adv Immunol* 14: 1, 1971.
2. Beer AE, Billingham RE: Maternally acquired runt disease. *Science* 179: 240, 1973.
3. Beer AE, Billingham RE: The immunobiology of mammalian reproduction. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, N. J., 1976.
4. Beer AE, Billingham RE, Head J: The immunologic significance of the mammary gland. *J Invest Dermatol* 63: 65, 1974.
5. Datta SK, Schwartz RS: Autoimmunization and graft versus host reactions. *Transpl Rev* 31: 44, 1976.
6. Heber-Katz E, Wilson D: Sheep red blood cell-specific helper activity in rat thoracic duct lymphocyte populations positively selected for reactivity to specific strong histocompatibility alloantigens. *J Exp Med* 143: 701, 1976.
7. Hellström KE, Hellström I: Lymphocyte-mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. *Adv Immunol* 18: 209, 1974.
8. Janeway CA (Jr), Wigzell H, Binz H: Hypothesis: Two different Vh gene products make up the T cell receptors. *Scand J Immunol* 5: 993, 1976.
9. Laguens RP, Colmerauer MEM, Segal A, Pasqualini CD: Antigenic differences between AKR lymphoma and thymus cells leading to the detection of a tumor antigen associated with immunological enhancement. *Int J Cancer* 21: 779, 1978.

10. Matusevich M, Comini Andrada E, Piazzon I, Pasqualini CD: Daño fetal en el ratón por pretratamiento de la madre con injertos de piel o de tumor de origen paterno. *Medicina (Bs Aires)* 40: 543, 1980.
11. Milgrom F, Comini Andrada E, Chaudhry AP: Fetal and neonatal fatality in rat hybrids from mothers stimulated with paternal skin. *Transpl Proc* 9: 1409, 1977.
12. Pasqualini CD: Why does a tumor grow? An experimental model for the study of the immunological mechanisms involved in tumor growth. *Allergol Immunopathol* 4: 449, 1976.
13. Pasqualini CD, Colmerauer MEM: Immunological enhancement of a murine allogeneic lymphoma. *Medicina (Bs Aires)* 36: 189, 1976.
14. Pasqualini CD, Colmerauer MEM: Active immunological enhancement of Sarcoma 180 in splenectomized Swiss mice. *Biomedicine* 25: 202, 1976.
15. Pasqualini CD, Matusevich M: Correlación entre el crecimiento tumoral y el crecimiento fetal. *Medicina (Bs Aires)* 39: 531, 1979.
16. Piazzon I, Déroche A, Pasqualini CD: Kinetics of the graft versus host reaction during allogeneic tumor enhancement. *Arch Geschwulstforsch* 50: 322, 1980.
17. Saal F, Colmerauer MEM, Braylan RC, Pasqualini CD: Tumor growth in allogeneic mice bearing a plastic cylinder. *J Natl Cancer Inst* 49: 451, 1972.
18. Simonsen M: The heterogeneity of lymphocytes. Return to square one. Int Cong Series 323, Allergology Excerpta Medica, Amsterdam, 1974.

— — — —

Wear your learning like your watch, in a private pocket; and do not pull it out and strike it, merely to show that you have one. If you are asked what o'clock it is, tell it, but do not proclaim it hourly and unasked, like the watchman.

Lleva tu ciencia, como tu reloj, en un bolsillo íntimo; no lo saques, no lo hagas sonar, nada más que para mostrar que tienes uno. Si te preguntan qué hora es, contéstalo, mas no vayas pregonándolo a cada hora y sin que te lo rueguen, como los serenos.

Lord Chesterfield (1694-1773)
Letters to his son

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 328-332 (1981)

INFECCION CON *TRYPANOSOMA CRUZI* EN RATONES CONGENITAMENTE ATIMICOS

ELSA L. SEGURA *, MONICA ESTEVA **, C. J. QUINTANS, L. S. MONTORO, MERCEDES C. WEISSENBACHER *

Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas Dr. Mario Fatala Chaben; Sección Bioterio, Comisión Nacional de Energía Atómica; Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La explicación de la resistencia durante las etapas aguda y crónica de la enfermedad de Chagas [4], así como el conocimiento de los mecanismos que fallan para que algunos pacientes no sobrevivan la infección aguda y otros queden lesionados en la crónica, son algunos de los puntos que se deberían dilucidar en la búsqueda de métodos activos o pasivos para curar o impedir la enfermedad. Se demostró que la respuesta inmune del huésped opera en la resistencia contra la infección por *Trypanosoma cruzi*, comparando la infección en animales irradiados [1] y/o tratados con inmunosupresores [17], con la producida en animales que no habían recibido tratamiento.

Existe un efecto protector del suero inmune transferido pasivamente a un animal infectado [5, 10]. Los inmunosueros pueden también aglutinar a los trypomastigotes, dependiendo de la cepa del parásito con que se trabaje y del período de la infección durante el cual se extraiga el inmunosuero [9], presentando mayor efecto aglutinante el suero de ratón obtenido después de las 6 semanas del comienzo de la infección [7].

Otro mecanismo de destrucción del parásito es la lisis mediada por complemento [2], la cual se observó con el suero de pacientes o de animales infectados en presencia de complemento. La participación de los anticuerpos en la resistencia a la infección ha sido estudiada con cepas de ratones Biozzi que difieren genéticamente en su capacidad de formar anticuerpos [8]. Después de la infección con *T. cruzi*, los ratones que responden más débilmente presentaron parasitemias más altas y mayor mortalidad que los ratones que responden con altos niveles de anticuerpos.

En cuanto a la participación de la inmunidad mediada por células en la resistencia contra la infección chagásica, existen experimentos que sugieren su importancia. Así, los ratones timectomizados neonatalmente, presentaron mayor parasitemia y más rápida mortalidad que los controles no timectomizados [19]. La administración de suero antitimocito también exacerba el curso de la infección [15] con *T. cruzi*. La transferencia de células linfoideas de bazo de ratones infectados protegió a los animales receptores de una infección posterior con *T. cruzi* [16, 18]. La carencia de células T funcionales convierte

— — — —

Recibido: 18-III-1981. Aceptado: 25-III-1981.

* Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Becaria del CONICET.

Dirección postal: INDIECH, Paseo Colón 568, 1063 Buenos Aires, Argentina.

al ratón congénitamente atímico en un modelo de laboratorio sumamente útil, para estudiar el papel de la inmunidad celular en la fisiopatología del daño, o en la defensa contra las infecciones. La mutación recesiva denominada "nude", y simbolizada "nu" fue descripta en el ratón por Flanagan [6], y llamó inicialmente la atención por causar ausencia de pelo, acompañada por un notable acortamiento del lapso de vida e inusual sensibilidad a las infecciones. El posterior descubrimiento de que estos ratones "desnudos" poseían un epitelio tímico deficiente que los incapacita para inducir la normal diferenciación de los linfocitos T [12, 13], llevó a esta mutante a ocupar un lugar destacado entre los animales de laboratorio. Kierszenbaum y Pienkowski demostraron que los ratones atímicos infectados con altas dosis de *T. cruzi* son más susceptibles a la infección que sus controles inmunológicamente competentes [8 bis].

En este trabajo se presentan los resultados del seguimiento de la infección con bajas dosis infectantes de *T. cruzi* en ratones genéticamente atímicos (nu/nu), en comparación con la infección de sus hermanos fenotípicamente normales (nu/+), de la misma camada.

Material y métodos

Animales: Se emplearon ratones de la cepa N: NIH (S) portadores de la mutación nude (nu). El núcleo inicial de reproductores provino del National Institutes of Health, Small Animals Section, Veterinary Resources Branch, de Estados Unidos de Norteamérica.

Los animales utilizados en este trabajo fueron criados en la Sección Bioterio, Departamento de Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica, bajo condiciones destinadas a asegurar la ausencia de patógenos específicos. Se utilizó para tal fin una instalación provista de un flujo laminar de aire tratado con filtros absolutos (H.E.P.A. 99.97 % eficiencia). Antes de ingresar al cuarto de cría el personal encargado del mismo se duchaba y vestía con ropa estéril, colocándose también gorro, barbijo y guantes. Se emplearon cajas de acero inoxidable, provistas de lecho de viruta de madera blanca y alimento Cargill en comprimidos RR. El agua se suministró mediante botellas de vidrio de 400 ml con tapones de goma y picos de acero inoxidable; todos esos elementos se renovaban una vez por semana. La totalidad del material se esterilizaba por autoclave, con excepción del alimento que se trataba con una dosis de 2.5 megarad de radiación gamma proveniente de una fuente de cobalto 60. El agua luego de esterilizada se llevaba a pH 2.5 con ácido clorhídrico. Para manejar los animales se usaban pinzan de disección que se mantenían sumergidas en antiséptico entre uso y uso. En este experimento se utilizaron 20 ratones machos de 22 a 30 días de edad y cuya constitución genética era nu/nu (timodeficientes) y nu/+ (eutímicos). Se obtuvieron apareando machos heterozigotas y hembras homozigotas (nu/nu). Este apareamiento da un rendimiento de 50 % de animales desnudos (nu/nu) y 50 % de animales con pelo (nu/+).

Durante el transcurso de la infección por *T. cruzi* los animales se mantuvieron en un cuarto aislado que no se había utilizado previamente con otros animales de experimentación. Se colocaron 5 animales por caja, protegiéndolos con tapas filtrantes de fibra poliéster. Las cajas se mantuvieron en una campana bajo presión positiva de aire esterilizado por filtración, que circulaba constantemente produciendo aproximadamente 8 cambios completos por hora.

Parásitos: Se utilizaron trypomastigotes de la cepa Tulahuen obtenidos de sangre de ratón Swiss, infectado siete días antes con 5 x 10^5 trypomastigotes por vía intraperitoneal.

La sangre se obtuvo por punción cardíaca, bajo flujo laminar y se recogió sobre heparina. El número de parásitos se determinó en una cámara de Malassez, de 0.8 mm^3 de capacidad. Para ratones Swiss de 30 días, una DL_{50} es igual a 5 x 10^3 parásitos, determinada por el método Reed y Muench [14]. La sangre conteniendo los parásitos se diluyó en medio RPMI con 5 % de suero fetal bovino.

Diseño experimental: Diez ratones nu/nu y 10 ratones nu/+ recibieron el total de la dosis de 5 x 10^3 parásitos en 0.2 ml de la dilución de sangre, por vía intraperitoneal. Se controló diariamente la evolución clínica y mortalidad de los animales. La parasitemia se determinó a los 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 34, 37 y 40 días después de la infección, extrayendo 5 μl de sangre de la cola a 5 ratones de cada grupo por punto y realizando el recuento por observación microscópica. Un segundo grupo de 20 ratones (10 nu/nu y 10 controles) recibió 5 parásitos en 0.2 ml por vía intraperitoneal.

Resultados

Ratones infectados con 5 x 10^3 parásitos:

Desde los 7 días post infección (pi), los ratones inmunocompetentes se observaron adinámicos y con el pelo erizado en contraposición a los ratones nu/nu, de apariencia normal. Estos signos siguieron sin variación a lo largo de la infección y hasta los 14 días pi en que murieron cinco (50 %) de los ratones inmunocompetentes; otro ratón murió el día 19 pi y el siguiente a los 25 días después de la infec-

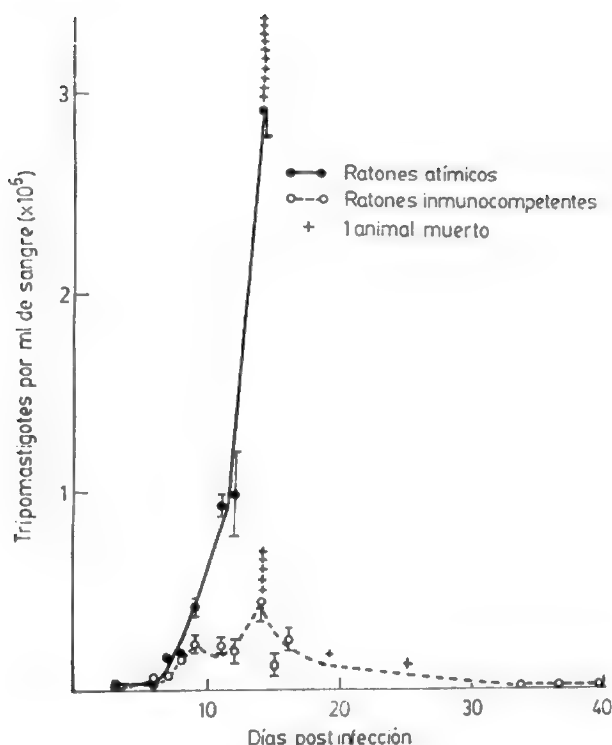


Fig. 1. — Niveles de parasitemia en ratones genéticamente atímicos (nu/nu) y controles inmunocompetentes (nu/+), infectados con 5×10^3 trypomastigotes de **T. cruzi** (cada punto representa el promedio de la parasitemia de 5 animales, a excepción de los días 34, 37 y 40 pi).
⊕ 2 desvíos standard (sólo cuando la diferencia fue estadísticamente significativa).

ción como se observa en la Figura 1. A los 30 días pi los tres ratones nu/+ sobrevivientes se mostraron recuperados. Los ratones nu/nu mostraron signos de exitación desde el noveno día presentando decaimiento y adinamia extrema desde el día 12 pi. En el día 14 después de la infección murieron los diez ratones inmunodeficientes (100 %).

La parasitemia (Fig. 1) comenzó ya al tercer día (500 *T. cruzi*/ml) en los ratones desnudos, observándose una fase lag de 4 días. El pico más alto de parasitemia (3×10^6 parásitos/ml) se observó al día 14 y coincidió con la mortalidad del total de los animales de este grupo. La parasitemia en los animales nu/+ comenzó a detectarse a los 6 días pi (2.8×10^3), llegando al pico máximo de 4.2×10^5 parásitos/ml en el día 14, durante el cual murió el 50 % de los animales infectados. La mejoría clínica de los animales sobrevivientes coincidió con la negativización de la parasitemia.

Como se observa en la Figura 1 hay una diferencia significativa de parasitemia entre el grupo de ratones atímicos y sus controles inmunocompetentes, desde el noveno día de la infección ($p < 0.001$, $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente).

Ratones infectados con 5 parásitos:

En este grupo se observaron parásitos en sangre de los ratones atímicos recién a los 7 días pi, siendo el pico de parasitemia (1×10^7/ml) a los 16 días pi, que coincidió con el 100 % de mortalidad de los ratones. En cambio, el 100 % de los controles inmunocompetentes sobrevivieron hasta los 60 días pi con una parasitemia apenas detectable.

Discusión

En este trabajo se corrobora que los ratones genéticamente atímicos resisten menos la infección por *T. cruzi*, que sus hermanos eutímicos, con las dosis utilizadas y según los parámetros de parasitemia y mortalidad. El motivo por el cual se utilizaron 5×10^3 parásitos para infectar un grupo de ratones fue que se demostró previamente que para ratones Swiss este número de parásitos equivale a 1 DL_{50}, a los 14 días pi. En este trabajo, se demostró que los animales nu/+ repetían este comportamiento, mientras se observaba en sus hermanos inmunodeficientes el 100 % de mortalidad a los 14 días. Los experimentos llevados a cabo realizando la infección con 5 parásitos muestran que los ratones nu/nu también mueren en un 100 %, mientras que sus hermanos eutímicos sobreviven en su totalidad hasta por lo menos 60 días pi, fecha de finalización del experimento. Estos últimos ratones (nu/+) parecen comportarse como los ratones Swiss [11] al recibir bajo número de parásitos.

Schmuñis y col. [19] describieron una mayor severidad en la evolución de la infección por *T. cruzi* en ratones timectomizados al nacer. Así observaron una parasitemia más alta y una sobrevida más corta en los ratones timoprivos, comparados con los controles inmunocompetentes. Posteriormente Kierszenbaum y Pienkowski [8 bis] confirmaron estos resultados utilizando ratones genéticamente atímicos, a los que

infectaron con 50 DL_{50} de tripomastigotes de la cepa Tulahuen. Ambos hallazgos concuerdan con los resultados que se discuten en este trabajo, y señalan que la falta de información proporcionada por el timo, ya sea en animales congénitamente atímicos o timoprivos quirúrgicamente, indica que la presencia del linfocito T es decisiva para la resistencia en la infección chagásica aguda de los ratones. El empleo de dosis masivas de parásitos para inducir una infección, puede enmascarar el efecto buscado. Así, cuando se emplearon 50 DL_{50} para infectar a los ratones atímicos y a sus controles, los autores [9] consiguen observar una diferencia de 5 días en la mortalidad acumulativa entre los ratones nu/nu y nu/+.

Esto se repite en nuestra experiencia utilizando 1 DL_{50} (5000 parásitos), mientras que en los animales inoculados con 5 parásitos la gran diferencia de mortalidad observada permite claramente determinar el grupo de los animales timoprivos de sus controles inmunocompetentes. Además, la mortalidad de los nu/nu se observó a los 16 días pi, lo cual facilitará el estudio de la respuesta humoral y los trastornos electrocardiográficos en estos ratones.

En este sentido, se están realizando estudios de anticuerpos humorales, electrocardiográficos e histopatológicos y se efectuarán experimentos de transferencia de linfocitos T en ratones timoprivos de cepas endocriadas.

A diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, los ratones genéticamente atímicos infectados con *Trypanosoma rhodesiense,* agente etiológico de la Trypanosomiasis Africana, presentaron menor parasitemia y menor mortalidad que sus hermanos inmunocompetentes, también infectados [3], lo cual indica que existe un mecanismo diferente de defensa en la infección por *T. rhodesiense,* comparado con el que se observa en la infección por *T. cruzi.*

Resumen

En este trabajo se intentó dilucidar el papel que juega la inmunidad celular en la enfermedad del ratón infectado con dosis bajas de T. cruzi, *comparando el curso de la infección de ratones congénitamente atímicos (nu/nu) con sus hermanos de camada fenotípicamente normales (nu/+). Para esto se infectaron ratones de ambos grupos de 4 semanas de edad, por vía intraperitoneal con 5000 ó 5 tripomastigotes de sangre. El curso de la enfermedad fue más severo en los ratones atímicos, con parasitemia significativamente más alta y promedio de sobrevida menor que en los controles inmunocompetentes, sugiriendo que en este caso, los linfocitos timodependientes tienen un papel importante en la defensa contra la infección con* T. cruzi.

Summary

Trypanosoma cruzi INFECTION IN CONGENITALLY ATHYMIC MICE.

Present evidence suggests that cellular immunity may play an important role in the acute and chronic T. cruzi *infection of animals and man* [7]. *Neonatal thymectomy was shown to cause higher parasitemia levels and mortality rates in mice infected with* T. cruzi [10]. *Congenitally athymic mice were shown to be more susceptible to high doses of* T. cruzi. *The role of T lymphocytes in the pathogenesis of* T. cruzi *infection was studied by comparing the course of the acute infection in congenitally athymic (nu/nu) mice with that in phenotypically normal littermates (nu/+). The strain used was N:NIH (S) which carries the mutant nu gene. Bloodstream trypomastigotes of the Tulahuen strain (5 x 10^3 or 5 organisms in 0.2 ml) were inoculated intraperitoneally into 4-week-old mice of two groups: 10 immunodeficient and 10 normal littermates. All animals were housed, in standard cages with a polyester filter cover and kept in an isolated room for 40 days. Sterilized standard laboratory food and water (pH 2.5) were provided* ad libitum. *Morbidity and mortality were recorded daily. Trypanosome counts were performed in fresh tail blood at 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 34, 37 and 40 days after infection. Figure 1 shows that no parasites were found in the blood of immunocompetent mice 3 days postinfection, whereas in athymic mice a low parasitemia was already present (500 parasites per*

ml). Trypomastigote counts in athymic mice increased steadily, reaching a peak at day 14, with 3×10^6 parasites per ml, a significantly higher number than in the phenotypically normal littermates which presented 4×10^5 parasites/ml on the same day. In nude mice, the course of the disease was more severe; curiously, all animals died on the 14th day. However, only 50 % of immunocompetent infected control mice died on that same day, the remainder surviving significantly longer. Nude mice infected with 5 Trypomastigotes, also failed to recover from the infection exhibiting 100 % mortality, while control mice likewise infected showed 100 % survival. The present experiment demonstrates that nude mice are more susceptible than immunocompetent mice to T. cruzi *acute infection with regard to parasitemia and mean survival time. Histopathological studies and antibody assays are now in progress while T-cell restitution experiments will soon be undertaken.*

Agradecimientos: Este trabajo fue realizado con fondos provenientes de subsidios otorgados por SECYT (Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología) y CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Bibliografía

1. Brener Z, Chiari E: The effects of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chagas disease. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 65: 629, 1971.
2. Budzko DB, Pizzimenti MC, Kierszenbaum F: Effects of complement depletion in experimental Chagas' disease: Immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 11: 86, 1975.
3. Campbell GH, Esser KM, Phillips SM: *Trypanosoma rhodesiense* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infect Immun* 20: 714, 1978.
4. Chagas C: Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidad morbida do homen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159, 1909.
5. Culbertson JT, Kolodny MH: Acquired immunity in rats against *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 24: 83, 1938.
6. Flanagan SP: "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res Camb* 8: 295, 1966.
7. Hanson WL, Roberson EL, Chapman WL, Logan LL, Chien JJ, Devlin RF: Studies on immunity in Chagas disease. *Proc 9 th Intern Congr Trop Med Mal* p 57, 1973.
8. Kierszenbaum F, Howard JG: Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: The importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J Immunol* 116: 1208, 1976.

8 bis. Kierszenbaum F, Pienkowski MM: Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 24: 117, 1979.

9. Krettli AV, Brener Z: Antigenic variation in bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* from different strains. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 18: 134, 1976.
10. Kulin RE, Durum SK: The outset of immune protection in acute experimental Chagas' disease C3H (ME) mice. *Intern J Parasitol* 5: 241, 1975.
11. Laguens RP, Cabeza Merckert P, Basombrío MA, Chambó GJ, Cossio PM, Arana RM: Infección experimental del ratón con *Trypanosoma cruzi*. Modelo experimental de Enfermedad de Chagas. *Medicina (Bs Aires)* 40: 33, 1980.
12. Pantelouris EM: Absence of a thymus in a mouse mutant. *Nature (London)* 217: 370, 1968.
13. Pantelouris EM: Observations on the Immunobiology of "Nude" mice. *Immunology* 20: 247, 1971.
14. Reed LJ, Muench HA: A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am J Hyg* 27: 493, 1938.
15. Roberson EL, Hanson WL, Chapman WL: *Trypanosoma cruzi:* effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. *Explt Parasitol* 34: 168, 1973.
16. Roberson EL, Hanson WL: Transfer of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 68: 338, 1974.
17. Rubio M: Estudio de los factores que intervienen en la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi*. Acción de la cortisona en la capacidad de invasión y multiplicación del parásito. *Biológica (Santiago)* 20: 89, 1954.
18. Santos RP: Contribução ão estudo da immunidade na fase aguda da doença de Chagas experimental. *Rev Pat Trop* 4: 433, 1973.
19. Schmuñis GA, González Cappa SM, Traversa DC, Yanovsky JF: The effect of immuno-depression due to neonatal thymectomy on infections with *Trypanosoma cruzi* in mice. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 65: 89, 1971.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 333-336 (1981)

EFECTOS DE LA CIPROHEPTADINA SOBRE LA SECRECION Y CONTENIDO PITUITARIO DE LA TIROTROFINA EN LA RATA

E. R. ULLOA *, R. J. BOADO *, R. E. BERETERVIDE, A. A. ZANINOVICH **

Laboratorio de Investigaciones Endocrinológicas, CONICET, Centro de Medicina Nuclear y 4ª Cátedra de Medicina, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires y Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires

Estudios previos han demostrado en animales de experimentación cantidades significativas de serotonina en el hipotálamo y la glándula hipófisis [4, 7]. También se observó en experimentos realizados in vitro, que la serotonina disminuyó la secreción de hormona liberadora de tirotrofina (TRH) por el hipotálamo de ratón [5], y que la inyección de 5-hidroxi-triptofano, un precursor de la serotonina, aumentó los valores de tirotrofina (TSH) sérica en la rata, mientras que la administración de paracloroanfetamina, compuesto que disminuye la concentración de serotonina en los tejidos hizo descender el nivel sérico de esta hormona [3]. Trabajos recientes de este laboratorio demostraron que la ciproheptadina, un antagonista de la serotonina, no produjo modificaciones en el metabolismo periférico de la tiroxina (T4) en la rata. En el presente trabajo se determinó si la ciproheptadina modifica la secreción de TSH hipofisaria o su respuesta al estímulo con TRH. También se determinó su efecto sobre el contenido pituitario de TSH.

Recibido: 24-II-1981. Aceptado: 8-IV-1981.

* Becario del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Miembro de la Carrera de Investigador, CONICET.

Dirección postal: Hospital de Clínicas, C.C. 29, Suc. 53, 1453 Buenos Aires, Argentina.

Material y métodos

Se utilizaron ratas Wistar hembra de aproximadamente 200 g de peso. Durante el estudio los animales fueron mantenidos a temperatura constante, con dieta normal y agua *ad libitum*.

Prueba de estímulo con TRH: El día anterior al estudio se inyectó ciproheptadina, 200 μg/100 g de peso vía ip, administrándose a tiempo 0, 100 μg/100 g de peso de esta droga por vía intravenosa. El grupo control recibió solamente el vehículo de la inyección. Para la prueba de estímulo con TRH se extrajo una muestra basal de sangre heparinizada, inyectándose luego 1 μg/100 g de peso de TRH por vía iv. Se repuso el volumen de sangre extraído con igual cantidad de solución fisiológica, obteniéndose otra muestra de sangre a los 10 minutos de la inyección de la TRH. Nuestra experiencia y la de otros autores indican que esta dosis de TRH produce una respuesta máxima en la secreción de TSH en el tiempo indicado [6].

Contenido pituitario de TSH: Para estudiar el efecto sobre el contenido pituitario de TSH se administró durante 10 días ciproheptadina, 4 mg/100 ml en el agua de beber. La dosis promedio de ciproheptadina ingerida por cada animal fue de 400 μg/día a través del estudio. El grupo control bebió agua sin ciproheptadina. Los animales fueron sangrados por punción cardíaca e inmediatamente les fue extraída la hipófisis, manteniéndolas congeladas a −20° C junto con los sueros, para su posterior procesamiento. Las hipófisis se homogeneizaron en baño de hielo a 4° C,

con 200 μl de buffer PBS (10 mM de fosfato pH 7.6, 0.15 M de ClNa, 0.1 % de NaN_3) [2]. El nivel de TSH sérica y en tejido hipofisario se midió por radioinmunoanálisis utilizando un método de segundo anticuerpo [1, 8]. La TSH para marcar, el standard y el antisuero fueron cedidos por el Programa de Distribución de Hormonas de Pituitaria de Rata (NIAMDD). El límite de sensibilidad del ensayo fue 10-20 ng utilizando el protocolo del NIAMDD modificado. Los resultados se expresan como media ± desviación standard. La evaluación estadística de los resultados se hizo por el test "t" de Student.

Resultados

En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos en las pruebas de estímulo con TRH. En el grupo control la TSH plasmática a tiempo 0 tuvo un valor promedio de 230 ± 47 ng/ml mientras que a los 10 minutos post-TRH aumentó a 1790 ± 604 ng/ml, lo que representa un incremento de 7.7 ± 1.5 veces. Cuando se inyectó ciproheptadina la TSH basal fue de 260 ± 110 ng/ml alcanzando a los 10 minutos de la inyección de TRH un valor de 1170 ± 524 ng/ml, es decir, 4.6 ± 1.8 veces el nivel basal. Este incremento fue significativamente menor que el obtenido en el grupo control ($p < 0.005$).

TABLA 1. — *Acción de la ciproheptadina sobre la respuesta de la TSH al estímul ocon 1 μg/100 g de peso de TRH*

	TSH ng/ml		
	Basal	10 min post-THR	Incremento *
Control (7):			
Media	230	1790	7.7
D. S.	± 47	± 604	± 1.5
Ciproheptadina (100 μg/100 g de peso) (7):			
Media	260	1170	4.6
D. S.	± 110	± 524	± 1.8
p:	NS **		< 0.005 ***

* Nº de veces el valor basal; ** Compara los valores basales entre sí; *** Compara el incremento producido por la TRH respecto al observado en el grupo control.

La Tabla 2 muestra los valores de TSH en la hipófisis. En el grupo control el contenido pituitario de TSH fue de 1730 ± 186 μg/glándula mientras que la concentración sérica de esta hormona fue de 620 ± 223 ng/ml. En los animales que recibieron ciproheptadina no hubo cambios en la concentración sérica de TSH cuyo valor fue de 610 ± 43 ng/ml. En cambio con el tratamiento crónico con ciproheptadina se observó una disminución significativa del contenido pituitario de TSH a 1360 ± 93 μg/glándula ($p < 0.005$).

TABLA 2. — *Acción de la ciproheptadina sobre la TSH sérica e hipofisaria*

	TSH	
	Concentración sérica ng/ml	Contenido pituitario μg/glándula
Control (6):		
Media	620	1730
D. S.	± 223	± 186
Ciproheptadina (5)*:		
Media	610	1360
D. S.	± 43	± 93
p:	NS	< 0.005

* Los animales recibieron ciproheptadina en el agua de beber, en cantidad aproximada a 400 μg por día.

Discusión

Estos resultados muestran que la administración de ciproheptadina no produjo variaciones apreciables en la concentración sérica basal de TSH, ya sea administrada en forma aguda o en forma crónica durante 10 días. En cambio, el tratamiento con esta sustancia disminuyó significativamente la respuesta hipofisaria a la TRH, y también el contenido pituitario de TSH, hallazgos que indicarían una menor producción de TSH por la hipófisis. Estudios preliminares de este laboratorio indican, asimismo, que la ciproheptadina puede disminuir la respuesta a la TRH en el hombre aunque los niveles basales de TSH sean normales.

El mecanismo por el cual la ciproheptadina produjo una disminución del contenido pituitario y una menor respuesta a la TRH, podría deberse a la acción específica de la ciproheptadina como bloqueador de la serotonina a nivel de los terminales nerviosos serotoninérgicos en la hipófisis [4, 7], los que de alguna manera

regularían el contenido pituitario de TSH. Otra posibilidad es que su acción se ejerza sobre los receptores hipotalámicos de serotonina. En el hombre la ciproheptadina produjo alivio del cuadro clínico de la tirotoxicosis, no obstante que la degradación de la T4 no se alteró [9]. Aunque el efecto que esta droga produce sobre la hipófisis, como se ve en este trabajo, concuerda con la mejoría de los síntomas de hipertiroidismo en el hombre, ambos hallazgos no pueden estar relacionados entre sí desde que en el hipertiroidismo la secreción de TSH está suprimida y la tiroides funciona en forma autónoma.

Este efecto de la ciproheptadina en pacientes con hipertiroidismo no tiene explicación aparente. Pero la evidencia experimental indica que en la rata esta sustancia tiene una acción de tipo inhibitorio sobre la producción normal de TSH o sobre la respuesta secretora al estímulo del hipotálamo.

Resumen

Se estudió la acción de la ciproheptadina sobre el contenido pituitario de TSH en la rata y sobre los niveles plasmáticos de TSH y su respuesta a la TRH. Se utilizaron ratas Wistar hembras de 200 g de peso. Para la prueba de estímulo con TRH se inyectó el día anterior ciproheptadina, 200 μg/100 g de peso ip administrándose a tiempo 0, 100 μg/100 g de peso de esta droga por vía iv. El grupo control recibió el vehículo solamente. Se extrajo una muestra de sangre basal y se inyectó 1 μg/100 g de peso de TRH iv obteniéndose otra muestra de sangre a los 10 min. Para estudiar el efecto sobre el contenido pituitario de TSH se administró a un grupo de ratas ciproheptadina en el agua de beber en una dosis promedio de 400 μg/día. Los animales fueron sangrados, luego se les extrajo la hipófisis, que fue homogeneizada a 4° C en 200 μl de buffer PBS. La TSH se midió por radioinmunoanálisis. En el grupo control la TSH basal fue de 230 ng/ml elevándose a los 10 min post-TRH a 1790 ng/ml, lo cual representa un incremento de 7.7 veces el valor basal. Los animales que recibieron ciproheptadina tuvieron una TSH plasmática basal de 260 ng/ml y a los 10 min post-TRH se elevó a 1170 ng/ml siendo el incremento sobre el valor basal de 4.6 veces ($p < 0.005$ vs control). En cuanto al contenido pituitario de TSH, en el grupo control fue 1730 μg/glándula, mientras que en los animales tratados con ciproheptadina fue de 1360 μg/glándula ($p < 0.005$ vs control). Se concluye que la ciproheptadina disminuyó significativamente la respuesta de la TSH a la TRH. Además, esta droga administrada en forma crónica produjo una disminución del contenido pituitario de TSH en la rata, por un mecanismo aún desconocido.

Summary

EFFECTS OF CIPROHEPTADINE ON THE SECRETION AND PITUITARY CONTENT OF THYROTROPHIN IN THE RAT.

The effects of a serotonin antagonist drug, ciproheptadine, on the secretion of thyrotrophin (TSH) and its response to thyrotrophin releasing hormone (TRH), and on the pituitary content of TSH in the rat were studied. Female Wistar rats weighing approximately 200 g were used. TRH test: Seven animals were injected with 200 μg/100 g body weight of ciproheptadine the day before the study. At time 0, 100 μg/100 g/B.W. of this drug were injected iv. The control group received the vehicle alone. Basal blood samples were drawn by cardiac puncture, and immediately 1 μg/100 g/B.W. of TRH was injected iv. Another blood sample was drawn 10 minutes after the TRH injection. To study the effects of chronic administration of ciproheptadine on the pituitary content of TSH, 400 μg of this drug were administred daily in the drinking water during 10 days, to another group of rats. The animals were exsanguinated by cardiac puncture, the hypophyses removed immediately and individually homogenized at 4° C in 200 μl of PBS buffer (10 mM phosphate pH = 7.6, 0.154 M ClNa, 0.1 % NaN_3) using a teflon-glass homogenizer. Pituitary and plasmatic TSH concentrations were measured by double-antibody radioimmunoassay (NIAM DD). In the control group, basal TSH

was 230 ng/ml while 10 minutes post-THR this value increased to 1790 ng/ml, thus representing a 7.7 fold increase over the basal TSH level. In the ciproheptadine-treated rats the basal TSH was 260 ng/ml, and the 10 minute post-TRH value rose to 1170 ng/ml; the increment was 4.6 fold the basal level ($p < 0.005$ vs control). The pituitary content of TSH was measured in another group of rats and it was 1730 μg/gland in the control group whereas in the civroheptadine-treated group this value decreased to 1360 μg/gland ($p < 0.005$ vs control). It is concluded that ciproheptadine decreased significantly the TSH response to TRH in the rat. Furthermore when ciproheptadine was administred chronically for 10 days there occurred a significant reduction in the pituitary content of TSH. The mechanism of this phenomenon is unknow.

Bibliografía

1. Boado RJ, Ulloa ER, Zaninovich AA: Degradación competitiva de la tiroxina en ratas adaptadas al frío. *Acta Physiol Latinoam* 28: 77, 1978.
2. Boado RJ, Ulloa ER, Zaninovich AA: Effect of estrogen on pituitary and serum thyrotropin and on thyroid gland secretion in the rat. Sixth International Congress of Endocrinology. Australia, 1980. Abs. Nº 316, p 367.
3. Chen HJ, Meites E: Effects of biogenic amines and TRH on release of prolactin and TSH in the rat. *Endocrinology* 96: 10, 1975.
4. Fuxe K, Hokfelt T, Johnson G, Ungersted J: Fluorescence microscopy in neuroanatomy. *In:* Contemporary research in neuroanatomy. Nauta WJ, Ebbesson SE (eds), Springer-Verlag, New York, 1970, 275 p.
5. Grimm Y, Reichlin S: Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH): neurotransmitter regulation of secretion by mouse hypothalamic tissue in vitro. *Endocrinology* 93: 626, 1973.
6. Lifschitz BM, Defesi CR, Surks MI: THS response to TRH in euthyroid rat. Dose response, time course and demonstration of partial refractoriness to a second dose of TRH. *Endocrinology* 102: 1775, 1978.
7. Piezzi RS, Larin F, Wurtman RJ: Serotonin, 5-hydroxy-indole acetic acid and monoamine oxidase in the bovine median eminence and pituitary gland. *Endocrinology* 86: 1460, 1970.
8. Ulloa ER, Boado RJ, Bosco S, Zaninovich AA: Efectos de la adrenalina y la ciproheptadina sobre el metabolismo periférico de la tiroxina en la rata. *Medicina (Bs Aires)* 140: 40, 1980.
9. Zaninovich AA, Degrossi O, Gotta H: Effects of cyproheptadine upon the peripheral metabolism of thyroxine in patients with thyrotoxicosis. *Proc Am Thyroid Ass*, Chicago, 1969.

— — — —

Les défauts de l'âme sont comme les blessures du corps: quelque soin qu'on prenne de les guérir, la cicatrice paraît toujours et elles sont a tout moment en danger de se rouvrir.

Los defectos del alma son como las heridas del cuerpo: cualquiera sea el cuidado que uno se tome para curarlos, la cicatriz aparece siempre y en cualquier momento está en peligro de reabrirse.

La Rochefoucauld (1613-1680)
Maximes

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 337-342 (1981)

HIPERTIROIDISMO POR TRIIODOTIRONINA (T3 - TOXICOSIS)

O. J. DEGROSSI, MIRTHA PINKAS, SARA EL TAMER, T. WATANABE, H. CLAUS, H. GARCIA DEL RIO

Gerencia de Aplicaciones de la Dirección de Radioisótopos y Radiaciones, Comisión Nacional de Energía Atómica y Sección Medicina Nuclear del Hospital Alemán, Buenos Aires

El hipertiroidismo tanto en la denominada enfermedad de Graves-Basedow (Graves), como en el nódulo hiperfuncionante o en las formas anómalas de tirotoxicosis, se presenta en general con valores séricos altos de tiroxina (T 4) y triiodotironina (T 3)[5, 23], reconocidas como las hormonas tiroideas con actividad metabólica. Desde hace varias décadas se indicó la existencia de cuadros de hipertiroidismo que se acompañaban de valores normales de yodo proteico sérico (PBI)[1, 16]. Se trataba de pacientes que cursaban la afección con tasas normales de ambas hormonas (T 4 y T 3) por alteración de la capacidad de transporte de las proteínas séricas, pero conservando valores altos de las fracciones libres de las mismas. La introducción del radioinmunoanálisis (RIA) como técnica de rutina en el laboratorio endocrino a comienzos de la década anterior posibilitó observar que ciertos casos de hipertiroidismo se acompañaban de aumento de una de las hormonas circulantes, conservándose la otra sin variaciones importantes[3, 14, 18, 22]. Presentamos 10 casos con cuadro de hipertiroidismo, con elevación de triiodotironina y conservación de los valores normales de tiroxina. Este tipo de tirotoxicosis ha sido denominada T3-hipertiroidismo, T3-toxicosis o hipertriiodotironemia[14, 19, 22, 23].

— — — —

Recibido: 22-I-1981. Aceptado: 25-III-1981.

Dirección postal: Comisión Nacional de Energía Atómica, Av. del Libertador 8250, 1429 Buenos Aires, Argentina.

Material y métodos

La Tabla 1 resume las características clínicas de los 10 pacientes. Seis presentaban cuadro de enfermedad de Graves (casos 1 a 6), perteneciendo 5 al sexo femenino; sus edades oscilaban entre 21 y 54 años (promedio: 39.7 años) y el tiempo de evolución de la afección era de entre 2 meses y cuatro años. Cuatro eran recidivas después de más de un año de suspensión y terapéuticas previas, en general con drogas antitiroideas. Uno de los casos (nº 4) había sido tratado dos años antes con radioyodo por enfermedad de Plummer. Las características más destacables eran el pequeño tamaño de los bocios, que no sobrepasaban los 30-35 g de peso, y la escasa magnitud de los síntomas y signos oculares.

Los otros 4 pacientes presentaban el cuadro característico del nódulo autónomo hiperfuncionante, dos de ellos con inhibición centellográfica del resto del tejido tiroideo. Todos pertenecían al sexo femenino y sus edades oscilaban entre 43 y 77 años (promedio: 66.3 años); uno de ellos había sido tratado previamente con drogas antitiroideas. El tamaño de los nódulos en ningún caso sobrepasó los 3 cm de diámetro máximo y tres de los pacientes (casos 7, 8 y 10) por sus características clínicas se incluían en la forma de cardiotirotoxicosis, a predominio de síntomas y signos de la esfera cardiovascular.

Los exámenes de laboratorio (Tabla 2) realizados fueron: captación tiroidea de ^{131}I, acompañada de prueba de inhibición cuando se lo

TABLA 1. — *Hipertiroidismo A T-3. Cuadro clínico*

	Edad	Sexo	Tiempo de evolución total enf.	Diagnóstico	Tiroides	Signos oculares
1	51	F	4 a	Graves: recidiva al año de suspender MMI	25 g	Exof. + Edema palp. + Quemosis +
2	21	F	2 m	Graves	30 g	Aument. hend. palp. Exof.
3	39	F	1 a	Graves	30 g	Exof. ojo izq. +
4	49	F	2 m	Graves: tratada 2 años antes Plummer	25 g	Aument. hend. palp. Quemosis +
5	24	M	2 a	Graves: recidiva al año de suspender MMI	30 g	Exof. +
6	54	F	4 a	Graves: recidiva a los 2 años de suspender ^{131}I y MMI susp.	35 g	Exof. + Leve edema palp.
7	76	F	1 a?	Plummer	BUN	
8	77	F	2 a?	Plummer: tratado con MMI hasta 4 m antes	BUN s/inhib.	
9	43	F	6 m	Plummer	BUN s/inhib.	
10	69	F	1 a	Plummer	BUN	

BUN: bocio uninodular; +: grado 1 de una clasificación de 1 a 4 en gravedad de signos; MMI: metilmercaptoimidazol; Graves: enfermedad de Graves Basedow; Plummer: enfermedad de Plummer.

TABLA 2. — *Hipertiroidismo A T-3. Valores de laboratorio*

	Captación ^{131}I (%) 1 h	24 h	48 h	T-4 (μg/100 ml)	T-3 (ng/ml)	TRH (200 μg iv) Valores de TSH (μU/ml) basal	20 min	40 min	60 min	Capac Trans T-3	Indice T-4 libre
1	14	52	41	11.2	3.25	1.8	1.8	< 1.5	< 1.5		
2		43	39	10.4	2.50	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5	1.04	3.4
										(0.86 - 1.13)	(1.1 - 4.6)
3	9	36	35	7.9	2.70	< 1.5	< 1.5		< 1.5	31	2.4
W:		37	40							(24 - 34)	
4	5	36	34	7.8	4.10	< 2.5	< 2.5	< 2.5	< 2.5		
W:		31	34								
5	12	49	38	11.3	2.50	1.5	1.6		0.7		3.1
6	17	50	44	10.1	2.85	0.5	0.5	0.5	0.5		
$\bar{X}$	11.3	44.3	38.5	9.8	2.98		Negativa				
DS ±	4.6	6.5	3.4	1.4	0.56						
7	25	44	41	7.4	3.80	< 2.5	< 2.5	< 2.5	< 2.5		
8	18	47	56	8.9	2.70	—	—	—	—		
9	16	48	48	11.5	2.35	< 1.5	< 1.5	< 1.5	< 1.5		
10	14	52	52	8.9	2.20	< 2.5	< 2.5	< 2.5	< 2.5		
$\bar{X}$	18.2	47.8	48.8	9.2	2.76		Negativa				
DS ±	4.1	2.9	5.4	1.5	0.63						

T-4 VN: de 4.5 a 13.0 μg/100 ml; T-3 VN: de 0.7 a 2.2 ng/ml hasta los 50 años de edad (entre los 70-80 años de edad VN: 0.4-1.5); TSH VN: menor de 7.5 μU/ml.

consideró necesario; centellograma tiroideo; tiroxina total sérica; triiodotironina sérica y tirotrofina sérica (estas tres por RIA); prueba de hormona liberadora de tirotrofina (TRH) (TRH Elea, 200 μg vía i v en bolo único) dosando tirotrofina (TSH). Ocasionalmente se realizaron determinaciones de capacidad de transporte utilizando T3 radiactiva (Cap Transp T-3) e índice de tiroxina libre. Las técnicas respectivas han sido descriptas con anterioridad [2, 5-10, 13]. Todas las determinaciones séricas fueron realizadas por duplicado. Los estudios de T4 y T3 fueron repetidos en varias ocasiones con intervalos de dos a cuatro días en las extracciones de las muestras, expresándose los promedios. Al diagnóstico de hiperfunción tiroidea se llegó por el cuadro clínico, los estudios de laboratorio y la respuesta a la terapéutica instituida.

Los dos grupos de pacientes fueron separados, indicándose la media ($\bar{x}$) y el desvío standard (ds) de cada uno. Las diferencias observadas se compararon mediante el test "t" de Student [12, 21].

Resultados

La Tabla 2 ilustra sobre los resultados de las distintas pruebas de laboratorio en los dos grupos de pacientes. Las captaciones de ^{131}I presentan valores altos, mostrando recambio más acelerado entre los pacientes con enfermedad de Graves. Las diferencias no son significativas. Las pruebas de inhibición muestran respuestas negativas.

La tiroxina total sérica indica valores de 9.8 μg/100 ml entre los pacientes con enfermedad de Graves (ds ± 1.4) y de 9.2 μg/100 ml ± 1.5 en los pacientes con nódulos hiperfuncionantes (p: ns). Los valores promedios de T3 son, respectivamente, de 2.98 ng/ml ± 0.56 y 2.76 ± 0.63 (p: ns). Las pruebas de TRH-TSH muestran respuestas negativas en todos los casos y los valores de capacidad de transporte y de índice de tiroxina libre en los pacientes en que se realizó el estudio son normales. La Tabla 2 muestra los valores individuales para cada una de las determinaciones y los rangos aceptados como normales para las distintas hormonas estudiadas.

Discusión

El hipertiroidismo cursa generalmente con cifras elevadas de T4 y T3 siendo más importante el incremento de T3 que aumenta frecuentemente entre 2 y 3 veces su valor promedio normal, mientras que la T4 sólo los duplica. Es también frecuente que después de los sesenta años el incremento de los valores de estas hormonas sea menos marcado. Ya hemos indicado que en un escaso número de pacientes los valores de yodo proteico y de T4 y T3, consecuentemente, están en rangos normales, por disminución de la capacidad de transporte de las proteínas séricas [1, 16]. Por otra parte, puede considerarse la existencia de hiperfunción tiroidea motivada por aumento de una sola de las dos hormonas tiroideas. El advenimiento de técnicas sencillas y sensibles para determinar las tasas séricas de T4 y T3 posibilitó pesquisar la existencia de estos tipos de hipertiroidismo. Se ha descripto el hipertiroidismo con T4 elevada y valores normales de T3 [3, 18]. La mayoría de los pacientes con estas características eran de edad avanzada y portadores de afecciones múltiples y complicadas. Quizás en estos pacientes se habría producido una disminución o inhibición de la conversión periférica (extratiroidea) de T4 a T3 de magnitud tal que descendieran los valores de T3 a nivel normal (está demostrado que la administración exógena de T4 a pacientes atirióticos, redunda en una elevación sérica de ambas hormonas por la conversión sérica antes mencionada). Existiría una cierta acción protectora en ciertas circunstancias en la conversión periférica de T4 a T3, como puede observarse en la tormenta tiroidea [4]. Por otra parte, en lo que respecta a T3, los valores en el geronte son francamente menores en el eutiroidismo que los indicados para adultos, por disminución de esta conversión periférica como causa aparente más importante, por lo cual cifras dentro de "rangos normales" pueden ser elevadas según la edad del paciente [11, 17].

Mucho más frecuente en la literatura es la referencia al T3-hipertiroidismo. Este tipo de tirotoxicosis, puede presentarse acompañando a cualquiera de las formas conocidas de hiperfunción tiroidea, aun en pacientes que han presentado la enfermedad por breve lapso, en recidivas después de distintos tipos de tratamiento (cirugía, drogas antitiroideas, radio-yodo),

etc. [14, 15, 19, 20, 22, 23]. Dado que las manifestaciones clínicas son las mismas que en el que podríamos denominar hipertiroidismo convencional, no se lo considera al T3-hipertiroidismo como una entidad distinta. Su frecuencia varía según las estadísticas de los distintos grupos entre el 4 y el 30 % [14, 22], pero esta última estimación sobrepasa en mucho a la obtenida por la mayoría de los autores. Se ha indicado que la deficiencia de yodo aumentaría la frecuencia de la T3-toxicosis. Hemos observado que en la endemia bociosa yodocarencial, bociosos eutiroideos presentan valores altos de T3, tal como se ha referido en otras áreas de endemia, lo que apoyaría esta posibilidad [6]. No está claro cuál es el mecanismo íntimo de producción de este tipo de hiperfunción tiroidea, siendo la causa más probable una anormalidad intratiroidea, si bien no existen estudios adecuados que permitan avalar esta presunción. Desde el punto de vista teórico, es posible considerar una conversión extratiroidea de T4 a T3 aumentada, si bien si este fuera el único mecanismo, tendría que acompañarse al mismo tiempo de una secreción tiroidea autónoma, pues de otra manera se produciría, por servo-mecanismo negativo, una inhibición hipofisotiroidea y no podría sustentarse la hiperfunción.

Los pacientes estudiados en esta presentación corresponden a dos tipos de hiperfunción tiroidea: seis de ellos eran portadores de enfermedad de Graves, tres en forma recidivada después de permanecer un año libres de sintomatología por tratamiento previo. En su anterior período de enfermedad habían presentado el cuadro convencional de hipertiroidismo con aumento de los valores de T4 y T3. Un cuarto paciente (caso 4) había presentado dos años antes un bocio uninodular tóxico, tratado exitosamente con ^{131}I, con restitución funcional del tiroides, recuperación del eje hipotálamo-hipófisotiroideo y desaparición centellográfica y clínica del nódulo autónomo. Los otros dos casos eran primigénitos. Lo más característico de los cuadros clínicos eran el pequeño tamaño de los bocios y la escasa manifestación de la sintomatología ocular. El segundo grupo estaba constituido por 4 pacientes con enfermedad de Plummer, tres de ellos de más de 65 años de edad, en donde predominaban los signos y síntomas cardiovasculares. Podría pensarse que los valores de T3 estaban dentro del límite máximo en el caso 10, pero debe recordarse la edad del paciente; ya hemos indicado [11] que los valores normales para esa edad están muy por debajo de la cifra consignada para adultos. La Tabla 2 muestra al pie los valores que hemos hallado en eutiroideos de edad avanzada.

Es posible que muchos pacientes de edad avanzada, portadores de nódulos autónomos, sean calificados como eutiroideos por los valores de T4 y T3 a pesar de las manifestaciones metabólicas y cardiovasculares, mientras que deberían incorporarse al grupo de T3-toxicosis si se tienen en cuenta los valores normales para la edad del paciente.

Es indudable que el T3-hipertiroidismo debe considerarse como posibilidad ante cualquier forma de hipertiroidismo que se acompañe de valores normales de T4, en especial de la fracción libre de esta hormona. Una consideración a tener en cuenta es que quizá esta forma de presentación de la tirotoxicosis sea una primera etapa de la afección que posteriormente se exteriorice con aumento concomitante de T4. Las mayores posibilidades diagnósticas actuales y el menor lapso promedio en arribar al mismo hacen que posiblemente se describan más casos de hipertiroidismo por T3; por otra parte, existirían pacientes en los que una alteración intratiroidea en los procesos de biosíntesis y proteólisis llevaría a una producción exagerada de T3 como respuesta a la noxa, sin la respuesta paralela de T4.

La prueba de TRH es indispensable para corroborar el diagnóstico en ciertos pacientes, como los Graves tratados, en camino hacia el hipotiroidismo. En cuanto a los estudios de capacidad de transporte y de índice de T4 libre y aun la determinación directa de esta fracción, sólo permiten corroborar los hallazgos sobre valores de T4 y T3 y descartar una presunta y rara alteración de las proteínas transportadoras, dado que un in-

cremento o deficiencia de las mismas se traduciría en un aumento o disminución de ambas hormonas. Otra posibilidad de error diagnóstico, el hipertiroidismo por T3 factitio por ingesta de T3, se acompaña naturalmente de una franca disminución de los valores de T4 y de la captación tiroidea de ^{131}I.

Resumen

La introducción del radioinmunoensayo en la determinación de hormonas tiroideas séricas, ha posibilitado la investigación de ciertos cuadros clínicos cuyos valores de laboratorio no concordaban con los hallazgos semiológicos. En especial se han observado cuadros de hiperfunción tiroidea con valores normales de tiroxina (T4) y elevación de las tasas séricas de triiodotironina (T3). Se han estudiado 10 pacientes con estas características: seis de ellos presentaban el cuadro de enfermedad de Graves sin grave componente oftálmico y bocios de pequeño tamaño; cuatro eran recidivas después de tratamientos con drogas antitiroideas (uno de ellos combinado con radioyodo). Las edades oscilaban entre 21 y 51 años y 5 pertenecían al sexo femenino. Los valores de captación tiroidea de ^{131}I eran 11.3 % ± 4.6 ($\bar{x}$ y ds) a la 1ª hora, 44.3 % ± 6.5 a las 24 h y 38.5 % ± 3.4 a las 48 hs; T4: 9.8 μg/100 ml ± 1.4; T3: 2.98 ng/ml ± 0.56; prueba de TRH dosando tirotrofina (TSH): negativa. Los cuatro casos restantes presentaban el característico cuadro de bocio nodular con nódulo caliente, dos de ellos sin inhibición del parénquima tiroideo restante. Los cuatro eran de sexo femenino y las edades oscilaban entre los 43 y 76 años. Los valores de captación en este grupo eran de: 18.2 % ± 4.1 a la 1ª hora, 47.8 % ± 2.9 a las 24 h y 48.8 % ± 5.4 a las 48 h; T4: 9.2 μg/100 ml ± 1.5; T3: 2.76 ng/ml ± 0.63. Prueba de TRH negativa. Se analizan los resultados obtenidos destacándose el valor de la determinación de la T3 sérica para su diagnóstico así como la de la prueba de TRH. Se destaca que se hace necesario tener en cuenta la edad del paciente al considerar los valores de T3 séricos, en especial en pacientes que sobrepasan la 5ª década de vida.

Summary

HYPERTHYROIDISM DUE TO TRIIODOTHYRONINE (T3-TOXICOSIS).

The development of radioimmunoassay techniques of serum thyroid hormones has improved the diagnostic possibilities of certain cases of hyperthyroidism. The so called T3-toxicosis presents normal T4 and PBI serum values and high rates of T3 serum values. Ten cases of T3-toxicosis are presented; six of them showed the characteristic picture of Graves disease with slight ocular signs and symptoms and small goiter. Four of the subjects were relapsed hyperthyroidisms treated previously with antithyroid drugs, one of them combined with radioiodine. The ages ranged between 21 and 51 years old and 5 were females. The ^{131}I 24 h thyroid uptake was 44.3 % ± 6.5; serum T4: 9.8 μg/100 ml ± 1.4; serum T3: 2.98 ng/ml ± 0.65; TRH-TSH test was negative. The other four cases showed "hot" nodular goiters, two of them with scintigraphic inhibition of the rest of the thyroid tissue. All were females and the ages ranged between 43 and 76 years old. The ^{131}I 42 h thyroid uptake was: 47.8 % ± 2.9; serum T4: 9.2 μg/100 ml ± 1.5; serum T3: 2.76 ng/ml ± 0.63; TRH-TSH test was negative. The importance of T3 determination and TRH-TSH test in the diagnosis of T3-toxicosis is emphasized. It is necessary to take into account the age of the patient in relation to serum T3 value in subjects over 50 years old.

Bibliografía

1. Altschuler N, Degrossi OJ, Enriori C, Hass C. Parisier H, Salvatti E: Discrepancia entre yodo proteico suérico y estado clínico tiroideo: una probable explicación. *Rev Argent Endocr Metab* 10: 208, 1964.
2. Artaveytía D, Degrossi OJ, Gotta H, Pecorini V: Consideraciones sobre el centellograma tiroideo. *Rev Clin Españ* 98: 266, 1965.

3. Britton KE, Quinn V, Ellis SM, Cayley ACD, Miralles JM, Brown BL, Ekins RP: Is "T4-toxicosis" a normal biochemical finding in elderly women. *Lancet* 2: 141, 1975.
4. Brooks MH, Waldstein SS, Bronsky D, Sterling KK: Serum triiodothyronine concentration in thyroid storm. *J Clin Endocrinol Metab* 40: 339, 1975.
5. Carneiro L, Scornavachi J, Cima ME, Watanabe T, Degrossi OJ: Valor clínico de la determinación de triiodotironina sérica. *Rev Biol Med Nucl* 9: 77, 1977.
6. Carneiro L, Watanabe T, El Tamer E, Varela A, Morán D, Rinaudo A, Staneloni L, Degrossi OJ: Respuesta de la hormona liberadora de tirotrofina (TRH) en pacientes portadores de bocio endémico (BE). Informe nº 449, Com. Nac. Energ. Atómica, Bs Aires, 1978.
7. Cima ME, García del Río H, Pecorini V, Watanabe T, Degrossi OJ: Valor clínico de la determinación de la tiroxina total sérica. *Sem Médica* 151: 793, 1977.
8. Degrossi OJ: La medicina nuclear en el diagnóstico de las afecciones tiroideas (actualización). *Rev Biol Med Nucl* 2: 57, 1970.
9. Degrossi OJ, Cabrejas M, Watanabe T, Carneiro L, Barmasch M, Altschuler N: Kinetic studies of human thyrotropin hormone. *Acta Endocrinol Panam* 4: 24, 1973.
10. Degrossi OJ, Forcher HM, Watanabe T: Normalización de la captación tiroidea de ^{131}I, de acuerdo a las recomendaciones del OIEA. Inf. nº 148, Com. Nac. Energ. Atómica, Bs Aires, 1965.
11. Degrossi OJ, Mollerach FE, Scornavachi J, Almeida CA, Cima ME, Casas OI de, Carneiro L: Valores séricos y recambio de hormonas tiroideas en el geronte. *Medicina (Bs Aires)* 38: 20, 1978.
12. Dixon WJ, Massey FJ (Jr): Introducción al análisis estadístico 2ª Ed. McGraw-Hill Book Co Inc., Madrid, 1965.
13. Forcher HM, Degrossi OJ: Triiodotironina marcada en el estudio de la función tiroidea in vitro. Inf. nº 166, Com. Nac. Energ. Atómica, Bs Aires, 1965.
14. Hollander CS, Mitsuma T, Nihei N, Shenkinan L, Burday SZ, Blum M: Clinical and laboratory observations in cases of triiodothyronine toxicosis confirmed by radioimmunoassay. *Lancet* 1: 609, 1972.
15. Hollander CS, Stevenson C, Mitsuma T, Pineda G, Shenkman L, Silva E: T-3 toxicosis in an iodine deficient area. *Lancet* 2: 1276, 1972.
16. Horwitz DL, Refetoff S: Graves disease associated with familial deficiency of thyroxine binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 44: 242, 1977.
17. Ingbar SH: Effect of aging on thyroid economy in man. *J Am Geriat Soc* 24: 49, 1976.
18. Joassoo A: T-4 thyrotoxicosis with normal or low serum T-3 concentration. *Australian and New Zeland J Med* 5: 432, 1975.
19. Kaplan MM, Utiger RD: Diagnosis of hyperthyroidism. *Clin Endocrinol Metab* 7: 97, 1978.
20. Shalet SM, Beardwell CG, Lamb AM, Gowland E: Value of routine serum-triiodothyronine estimation in diagnosis of thyrotoxicosis. *Lancet* 2: 1008, 1977.
21. Steel RGD, Torrie SH: Principles and procedures of statistics. Ed.. McGraw-Hill Book Co. Inc., London, 1960.
22. Utiger RD: Serum triiodothyronine in man. *Annual Review of Medicine* 25: 289, 1974.
23. Werner SC, Ingbar SH (ed.): The Thyroid. Harper & Row, New York, 1977.

— — — —

It is not the possession *of knowledge that makes the man of science but his persistent and relentlessly critical quest for truth.*

No es la *posesión* del conocimiento lo que hace al hombre de ciencia sino su persistente e implacable búsqueda crítica de la verdad.

KARL POPPER

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 343-348 (1981)

EFICIENCIA RELATIVA DE LOS INCREMENTOS DE ENERGIA Y DE PROTEINAS EN NIÑOS DESNUTRIDOS *

MARIA ESTHER RIO °°, MARIA DEL CARMEN MORASSO, NORMA PIAZZA °°°, SARA CLOSA, H. GARCIA, CAROLA MEREDITH, L. HEFFES NAHMOD, MARIA E. L. BACIGALUPPI, J. GONZALEZ

Departamento de Bromatología y Nutrición Experimental, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Instituto de Nutrición del Noroeste Argentino, Salta; Departamento de Pediatría del Hospital Nacional A. Posadas, Haedo, Provincia de Buenos Aires

El estudio de las interrelaciones metabólicas entre proteínas y energía ha sido una de las áreas que desde hace mucho tiempo ha despertado más interés entre quienes realizan trabajos de investigación en nutrición experimental; es así que se han establecido en forma cuantitativa el denominado "efecto de ahorro" de los carbohidratos [6] y la dependencia existente entre aporte energético y utilización proteica [9, 11, 13], y se ha demostrado fehacientemente que la proporción de la energía de la dieta que debe ser provista a partir de proteínas es una función logarítmica de la velocidad de crecimiento [1]. Los resultados en animales han sido llevados a modelos matemáticos que permiten, a partir de valores conocidos de ingesta, predecir las respuestas y determinar las condiciones óptimas para diferentes estados fisiológicos y características de la dieta [6]. Determinar las cantidades óptimas de proteínas y energía que es necesario suministrar al niño desnutrido para asegurar la rápida recuperación, es también un campo de gran interés en nutrición pediátrica; sin embargo, son escasos los intentos que se han realizado para evaluar y predecir respuestas de acuerdo a modelos matemáticos, similares a los utilizados en animales. En razón de esto, la mayor parte de las controversias acerca de la terapia de realimentación más adecuada se basan en criterios dispares y mientras algunos autores, que toman como referencia la velocidad de ganancia de peso, ponen el énfasis primordial en la energía [10], otros sostienen que, independientemente de los cambios ponderales, la normalización de algunos parámetros bioquímicos depende sólo del aporte de proteínas [15, 17]. Debido a que la capacidad funcional del organismo depende en gran medida de sus proteínas, este segundo criterio aparece a nuestro entender como más extricto, ya que la recuperación del peso puede hacerse sin recuperación de la "capacidad

---

Recibido: 6-X-1980. Aceptado: 2-IV-1981.

° Parcialmente presentado a la XXIII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Buenos Aires, 1978.

°° Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

°°° Becaria de la CIC (Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires).

Dirección postal: Departamento de Bromatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina.

TABLA 1. — *Valores estadísticos de nitrógeno retenido expresado en mg de N/kg/día para combinaciones de energía constante y rangos fijos de concentración proteica*

Niveles de ingesta energética (E) (Cal/kg/d)	Rangos de calorías proteicas (Cal prot/100 Cal dieta)				
	6-9	9.1-12	12.1-15	15.1-18	> 18
110	0 [a]	120 [a]	330 [a, b]	425 [a]	475 [b]
130	100 [a]	200 [a]	380 [a, b]	560 [a]	780
150	150 [a]	270 [a]	440 [a, b]	660 [a]	900 [b]
170	200 [a]	320 [a]	470 [a, b]	720 [a]	980 [b]
190	210 [a]	350 [a]	490 [a, b]	760 [a, b]	1000 [b]

a Datos obtenidos a partir de balances realizados con proteína de leche de vaca; **b** Datos obtenidos a partir de balances realizados con proteína de soja.

funcional", en la medida en que no corresponda a una composición corporal normal. Tal el caso de los niños descriptos por Kerr y col [10] que siguen reteniendo cantidades anormalmente elevadas de nitrógeno mucho tiempo después de haber logrado el peso esperado, y en los cuales puede suponerse que la ganancia de peso no se corresponda con una recuperación equivalente de la capacidad funcional. El ideal, desde el punto de vista clínico-nutricional, parecería ser determinar las cantidades y proporciones óptimas para asegurar no sólo el acelerado crecimiento compensatorio, sino que la normalidad bioquímica y funcional se alcance simultáneamente. Para ello, hemos realizado un análisis de la eficiencia relativa de incrementos constantes de proteínas y de energía, tomando como base de comparación los incrementos producidos en la retención nitrogenada como consecuencia de la modificación de una variable, manteniendo la otra constante.

Material y métodos

Los datos experimentales se obtuvieron sometiendo 56 niños, con desnutrición de 2º y 3º grado, de acuerdo a la clasificación de Gómez [7], a estudios de balance nitrogenado. Los niños, cuya edad osciló entre 1.55 y 18.7 meses, recibieron dietas a base de proteínas de leche de vaca (46 niños) o soja (10 niños); la ingesta de energía cubrió un amplio rango, entre 70 y 220 Cal/kg/día y la concentración de proteína (P %) —expresada en calorías aportadas por la proteína cada 100 calorías de alimento— osciló entre 6 y 19.1.

Los balances metabólicos se realizaron de acuerdo a la técnica descripta por Viteri [18]; el nitrógeno se determinó en dieta, orina y heces por el método de Kjeldahl (AOAC, 1965).

Análisis de información: A partir de los datos experimentales de retención nitrogenada e ingestas de nitrógeno y energía se aplicó el análisis de regresión múltiple propuesto por Fuller [6], agrupando los niveles de P % por rangos entre 6 y 9; 9.1 y 12; 12.1 y 15; 15.1 y 18 y mayor de 18. Se obtuvieron así los valores estadísticos para el balance nitrogenado a ingestas fijas de energía: 110, 130, 150, 170 y 190 Cal/kg/día (Tabla 1). Con estos datos se construyó un block completo 5 × 5 sobre el que se determinaron los incrementos producidos por cada 20 Cal adicionales, a P % constante, y por cada 3 unidades de P %, a nivel de energía constante. La eficiencia se expresó como mg de N retenido por Cal adicional o por Cal proteica adicional. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test de rangos múltiples según Duncan [5], promediando sobre todos los niveles de P % cuando se evaluó la eficiencia de la energía, y sobre todos los niveles de energía cuando se analizó la eficiencia de los incrementos de la concentración proteica.

Debido a que los niveles de energía que aseguran el equilibrio nitrogenado dependen de la concentración proteica de la dieta [16], se seleccionó como límite inferior de la ingesta energética 110 Cal/kg/d que coinciden con el valor de B = 0 para el menor rango de P % utilizado en este estudio. Todos los otros niveles de P % permitieron el mantenimiento del equilibrio nitrogenado con menores ingestas energéticas.

Resultados

Eficiencia de los incrementos de energía: A partir del valor de 110 Cal/k/d, determinado según se detalla arriba, se fijaron niveles energéticos cada 20 Cal. Los efectos de una caloría adicional sobre la retención nitrogenada a niveles fijos de P % y para incrementos constantes de 20 Cal, se muestran en la Tabla 2. Resulta evidente que al promediar sobre todos los niveles de P % la eficiencia de los in-

TABLA 2. — *Influencia del aumento de energía sobre la eficiencia de la retención nitrogenada expresada en mg de N por caloría adicional, a niveles constantes de concentración proteica*

Niveles de calorías proteicas (P %) Cal prot/100 Cal dieta)	Rangos de ingesta energética (Cal/kg/día)				
	ΔE_I 110-130	ΔE_{II} 131-150	ΔE_{III} 151-170	ΔE_{IV} 171-190	Promedios [a]
	Eficiencia en mg de N/caloría adicional				
7.50	5.0	2.5	2.5	0.5	2.62
10.50	4.0	3.5	2.5	1.5	2.87
13.50	2.5	3.5	2.0	2.5	2.62
16.50	6.7	5.0	3.0	2.0	4.17
19.10	15.2	6.0	4.0	1.0	6.55
Promedios [a,b]	6.68	4.10	2.80	1.50	

a Mínima diferencia significativa: 3.41; b Los números sobre la misma línea no presentan diferencias significativas al nivel del 5 %.

crementos de energía va disminuyendo progresivamente, hecho que concuerda con los hallazgos de Fuller y col [6] y que se debe a que la retención nitrogenada es una función curvilínea de la ingesta energética. Curiosamente, los valores numéricos promedio de este estudio coinciden con los de Fuller en ratas [6] que van desde 5.6 mg de N/Cal adicional hasta menos de 2 mg para ingestas energéticas elevadas.

El análisis estadístico demuestra que la máxima eficiencia se encuentra en las primeras 40 calorías adicionales.

Un análisis individual para cada valor de P % permite extraer además otras conclusiones de importancia. Las mayores eficiencias se obtienen para valores altos de P %, y para las calorías adicionales entre 110 y 130 la eficiencia es 3 veces mayor a P % 19.5 que a P % 7.50. Las diferencias entre niveles de P % disminuyen a ingestas energéticas elevadas y para 171 y 190 no existen diferencias significativas entre niveles de P %. Cuando se promedia las eficiencias para un P % fijo, sobre todos los incrementos de energía, no existen diferencias significativas entre 7.5 y 16.5, obteniéndose la máxima eficiencia al nivel de 19.1 % ($p < 0.05$).

Eficiencia de los incrementos de proteína: La eficiencia de los incrementos en la concentración proteica a niveles constantes de ingesta energética se muestra en la Tabla 3. En forma inversa a lo ob-

TABLA 3. — *Influencia del aumento de la concentración proteica sobre la eficiencia de la retención nitrogenada expresada en mg de N por caloría adicional, a niveles constantes de ingesta energética*

Niveles de ingesta energética (E) (Cal/kg/día)	Rangos de calorías proteicas (Cal prot/100 Cal dieta)				
	$\Delta P\%_I$ 7.5-10.5	$\Delta P\%_{II}$ 10.51-13.5	$\Delta P\%_{III}$ 13.51-16.5	$\Delta P\%_{IV}$ 16.51-19.1	Promedios [a]
110	40	60	33	16	37.2
130	33	60	60	73	56.2
150	40	60	77	80	62.5
170	40	60	77	87	66.0
190	46	46	90	90	68.0
Promedios [a,b]	39.8	57.2	66.0	69.2	

a Mínima diferencia significativa: 22.8; b Los números sobre la misma línea no presentan diferencic significativa al nivel 5 %.

servado al incrementar la energía, los aumentos de la concentración proteica se reflejaron en un aumento sostenido de la eficiencia; excepto para el nivel de 110 Cal/kg/d, en el que a elevada concentración de proteínas la energía pudo haberse convertido en el factor limitante [11], la eficiencia fue aumentando con cada ΔP %. Al promediar sobre todos los niveles de energía el efecto máximo se observó entre los dos primeros incrementos y tiende a desaparecer a partir de 16.5 %. Es particularmente interesante destacar que a partir de 130 Cal/kg/d no se observaron diferencias significativas con los diferentes valores de energía, como si superado un cierto nivel crítico la eficiencia se hubiera hecho sólo dependiente de la concentración de proteína.

Discusión

El análisis en conjunto de los resultados de las Tablas 2 y 3 permite concluir que una vez superado un cierto nivel crítico de ingesta energética, la sustitución de una caloría de carbohidratos o de lípidos por una caloría proteica resulta mucho más eficiente para aumentar la retención nitrogenada, que un incremento neto de 10 Cal en la ingesta. Mientras un incremento de la concentración proteica equivalente a 1 Cal da por resultado un aumento en la retención nitrogenada promedio de 54 mg con un mínimo de 16 y un máximo de 90, la ingestión de una caloría adicional sólo aumenta la retención nitrogenada promedio en 3.77 mg, con un máximo de 15.2 y un mínimo de 0.5. Excepto para el nivel de ingesta de 110 Cal/kg/d, donde la eficiencia de la proteína disminuyó para niveles de P % superiores a 13.5, la eficiencia del incremento en la concentración de proteína fue unas 10 veces mayor que la del aumento del consumo, siendo la diferencia significativa al nivel de $p < 0.00001$ [5]. Merece destacarse que aún en el nivel de energía en el cual se observa disminución de la eficiencia proteica, el nitrógeno retenido por caloría proteica adicional fue comparable al nitrógeno retenido por caloría adicional, en los niveles de máxima eficiencia de la ingesta energética (16.0 vs. 15.2).

La más probable explicación para el sostenido aumento de la eficiencia de la retención nitrogenada observada al aumentar el P % —dentro de los rangos empleados en este estudio— se basa en la significativa mejora que se produce en la utilización de la proteína alimenticia como consecuencia del aumento de su concentración en la dieta de recuperación del niño desnutrido. Este hecho, que ha sido demostrado por nosotros en trabajos previos [3, 12] y que se halla en contraposición con los clásicos postulados de Miller y Payne [11], ha sido también descripto por otros investigadores a nivel de animales de laboratorio. Particularmente relevantes para interpretar nuestros hallazgos resultan los trabajos de Conde y Scornik [4], Young y col [19] y Haverberg y col [8] quienes, coincidentemente, observaron que en individuos en estado de depleción proteica la pérdida de nitrógeno de los tejidos se reduce significativamente durante el período de realimentación, por un mecanismo de inhibición del catabolismo endógeno cuya magnitud sería directamente proporcional a la concentración proteica de la dieta de recuperación.

Resumen

La cantidad óptima de energía y de proteínas que es necesario suministrar al niño desnutrido para asegurar una rápida recuperación, es uno de los campos de la nutrición que despiertan más interés y más controversias. En este trabajo hemos realizado un análisis comparativo de las eficiencias relativas de incrementos constantes de ingesta energética (E) y concentración proteica (P %), tomando como base de comparación los incrementos producidos en el balance nitrogenado (B) como consecuencia de la modificación de una variable, manteniendo la otra constante. Los datos experimentales se obtuvieron sometiendo 56 niños con 2º y 3º grado de desnutrición, de acuerdo a la clasificación de Gómez, a estudios de balance nitrogenado. Los niños entre 1.5 y 18.7 meses de edad, sin patologías asociadas, recibieron dietas a base de proteínas de leche de vaca (46 niños) o de soja (10 niños); la ingesta

energética cubrió un amplio rango, entre 70 y 220 Cal/k/d y la concentración proteica (P %) —expresada como calorías aportadas por la proteína por cada 100 calorías de dieta— osciló entre 6.0 y 19.1. La eficiencia relativa se analizó según un modelo de doble block completo 5 × 5, para intervalos de 20 Cal y 3 unidades de P %. Manteniendo constante el P %, la eficiencia de los incrementos de energía (mg de N retenido por Cal adicional consumida) cayó desde un promedio de 6.68 a 1.50 a medida que la ingesta energética aumentaba de 110 a 190 Cal/kg/d, siendo el comportamiento similar para cualquier nivel de P %. Por el contrario, la eficiencia aumentó sostenidamente a medida que la concentración proteica aumentó de 6.0 a 9.1, —39.8 a 69.2 mg N/Cal proteica adicional— no observándose diferencias significativas una vez superadas las 130 Cal/k/d. Para niveles de (E) inferiores a 110 Cal/k/d, la eficiencia disminuyó al aumentar el P %. Los resultados se interpretan como consecuencia de un aumento en la utilización proteica debida a la inhibición del catabolismo endógeno que se produce en individuos deplecionados durante el período de repleción y que es directamente proporcional a la concentración de la proteína en la dieta de recuperación.

Summary

EFFICIENCY OF NITROGEN RETENTION AS A FUNCTION OF ENERGY INTAKE AND PROTEIN CONCENTRATION IN UNDERNOURISHED CHILDREN.

The necessary amount of energy and protein intake and their interrelationships for the rapid recovery of undernourished children is one of the fields of pediatric nutrition that raises more interest and controversies [3, 10, 15, 17]. In this paper we have compared the relative efficiency of energy intake (E) and protein concentration (P %) to promote nitrogen retention in undernourished children. A group of children suffering 2nd or 3rd degree malnutrition, according to Gómez classification [7] without clinical complications, were studied. Nitrogen balance studies were carried out according to Viteri et al [18] using diets containing milk protein (46 children) or soya protein (10 children); energy intake ranged from 70 to 220 KCal/kg/d, and protein concentration, expressed as energy from protein per 100 dietary calories, from 6.0 to 19.1. The relative efficiency of increasing (E) or (P %) was analyzed according to Duncan [5] by a complete double block 5 x 5 model (Table 1), for intervals of 20 KCal/kg/d (Table 2) and three units P % (Table 3). At constant P %, the efficiency of Nitrogen (N) retention (mg N retained by each additional Cal consumed) fell from an average of 6.68 to an average of 150 as (E) increased from 110 to 190 KCal/kg/d, with a similar trend for all the levels of protein concentration (Table 2). On the other hand, efficiency of N retention (mg N retained by additional protein Calorie) increased significantly from an average of 39.8 to an average of 69.2 as protein concentration increased from 2.5 to 19.1 (Table 3), with no significant differences attributable to (E) level beyond 130 Kcal/kg/d. Only when (E) was below 110 Kcal/kg/did increases in P % result in decreased efficiency [11, 13]. The results are explained on the basis of increase in protein utilization [3, 12] due to the inhibition of endogenous catabolism which is produced in depleted individuals during the repletion period [4, 8, 19] and is directly related to dietary protein concentration [14].

Agradecimientos: Parcialmente financiado por la Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología, por la Secretaría de Estado de Salud Pública y por la Organización de Estados Americanos.

Bibliografía

1. Bernhardt FW: Correlation between growth rate of the suckling of various species and the percentage of total calories from protein in the milk. *Nature* 191: 358, 1961.
2. Barnes RH, Kwong E: Effect of different postnatal periods of protein-energy malnutrition in young rats upon subsequent protein utilization. *J Nutr* 107: 412, 1977.
3. Closa SJ, Meredith C, Rio ME, Cargatagli R, O'Donnell A: Protein and energy requirements in infants recovering from malnutrition. *Nutr Rep Internat* 16: 557, 1977.

4. Conde RD, Scornik OA: Role of protein degradation in the growth of livers after nutritional shift. *Biochem J* 158: 385, 1976.
5. Duncan DB: Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1, 1955.
6. Fuller MF, Boyne AW, Atkinson T, Smart R: The effect of increasing energy intake on the utilization of dietary protein of various qualities. *Nutr Rep Internat* 7: 175, 1973.
7. Gómez F, Ramos Galván R, Frenk S, Cravioto J, Chaves R: Mortality in second and third degree malnutrition. *J Trop Pediat* 2: 77, 1956.
8. Haverberg LN, Deckelbaum L, Bilmazes C, Munro HN, Young VR: Myofribillar protein turnover and urinary N-methylhistidine output. *Biochem J* 152: 503, 1975.
9. Jansen GR, Verburg DT: Amino acid fortification of wheat diets fed at varying levels of energy intake to rats. *J Nutr* 107: 289, 1977.
10. Kerr D, Ashworth A, Picou D, Poulter N, Seakins A, Spady D, Wheeler E: Accelerated recovery from infant malnutrition with high calorie feeding. *In:* Endocrine aspects of malnutrition. California The Kroc Foundation. RI Gardner and P Amacher (eds) 1973, p 467.
11. Miller DS, Payne PR: A theory of protein metabolism. *J Theoret Biol* 5: 398, 1963.
12. Morasso M del C, D'Andrea S, Ovando MT, Río ME, Closa SJ, Meredith C: Protein utilization in undernourished infants: effects of energy intake and Protein: Energy ratio. *Nut Rep Internat* 20: 353, 1979.
13. Morrison AB, Sabry ZI, Gridgeman NT, Campbell JA. Evaluation of protein in foods. VIII. Influence of quality and quantity of dietary protein on net protein utilization. *Canad J Biochem Physiol* 41: 275, 1963.
14. Nettleton JA, Hegstedt DM: Protein-energy interrelationships during dietary restriction: Effect on tissue nitrogen and protein turnover. *Nutr Metabol* 18: 31, 1975.
15. Olson RE, Houser RM, Hall AL, Kulapongs P, Bhamarapravati S, Bunyaretvej S, Suskind R, Thanangkul O: The effect of protein-calorie malnutrition upon the synthesis of the vitamin-K dependent coagulation factors. Proc XI Int Congr Nutrition, Brasil, 1978. (Abst 254).
16. Rao CN, Naidu AN, Narasinga Rao BS: Influence of varying energy intake on nitrogen balance in men on two levels of protein intake. *Am J Clin Nutr* 28: 1116, 1975.
17. Sirisinsha R, Suskind R, Edelman R, Charupatana C, Olson RE: Complement and C_3 — proactivator levels in children with protein — calorie malnutrition and effect of dietary treatment. *Lancet* 11: 1016, 1973.
18. Viteri F, Alvarado J: Evaluación de las proteínas en humanos con énfasis en metodología. *En:* Recursos proteínicos en América Latina. Publicación INCAP L-1, 1971.
19. Young VR, Stothers SC, Vilaire G: Synthesis and degradation of mixed proteins and composition changes in skeletal muscle of malnourished and refed rats. *J Nutr* 101: 1379, 1971.

— — — —

We are designed, coded, it seems, to place the highest priority on being individuals and we must do this first at whatever cost, even if it means disability for the groups.

Estamos planificados, pareciera codificados, para que el ser individuos tenga la más alta prioridad, y debemos "hacer" esto primero cualquiera sea el costo, aunque signifique un perjuicio para el grupo.

LEWIS THOMAS

The medusa and the snail, 1979

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 349-353 (1981)

INDUCTION OF HUMORAL AUTOIMMUNE RESPONSE TO RAT MALE ACCESSORY GLANDS

MIRIAN GALMARINI * CLELIA M. RIERA, SUSANA PESOA, C. VULLO, ELSA VOTTERO - CIMA

Cátedra de Inmunología y Serología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

The induction of autoimmunity has been the subject of intensive research during recent years [1, 6, 10, 14]. Among the various experimental models developed in this field, experimental autoimmunity against rabbit male accesory glands has been extensively investigated by our research group. This was obtained by several procedures [11, 20, 21]. It seems that in rabbit seminal plasma some molecules behave as autoantigens, whereas others are normally tolerated [16]. In addition, when female rabbits are injected with rabbit male accessory glands, their humoral response has a molecular specificity similar to that of male animals (unpublished work). Moreover, subsequent studies indicated that post-natal development and the tissue localization of both macromolecules are similar [9, 15, 17]. Their varied behavior in immunization needed to be thoroughly investigated since the results obtained were not very consistent. The above facts prompted us to continue this study using the same experimental model, but shifting to animals of an inbred strain, in an attempt to obtain more uniform results and to eliminate the interference of allotypes of macromolecules or of an allogenic effect. The purpose of the present work was to assav several immunization schedules in order to select the one that induces the best humoral autoimmune response in an attempt to investigate the mechanism involved in autoimmunogenecity.

Material and methods

A total of 64 adult male and female inbred Wistar rats weighing 200-400 g, were used. The animals were isoimmunized intradermally either with native or chemically modified male accesory glands saline extract [18]. The antigens were emulsified with more than complete Freund's adjuvant (5 mg *M. tuberculosis* per ml) according to previous work [4, 7, 10, 13]. The immunization schedules are shown in Table 1. The experimental animals were bled before each treatment and at the time they were sacrificed, about two weeks after the second injection.

The autoimmune response was studied by passive hemagglutination and inhibition of hemagglutination [2, 12], double diffusion gel precipitation [5] and passive cutaneous anaphylaxis tests [8]. In order to perform 2-mercaptoethanol treatment of sera, samples of various bleedings from each animal were subjected to the procedure of reduction and alkylation [3].

Statistical studies were performed employing the G distribution test.

— — — —

Received: 16-VII-1980. Accepted: 11-III-1981.

Postal address: Laboratorio Central, Hospital Nacional de Clínicas, Santa Rosa 1564, 5000 Córdoba, Argentina.

TABLE 1. — *Immunization schedules*

	Group I	Group II	Group III
First injection	Rat male accessory glands saline extract 90 mg	Rat male accessory glands saline extract 5 mg	Chemically modified rat male accessory glands saline extract * 25 mg
Interval between injections	2 months	1 month	1 month
Second injection	Rat male accessory glands saline extract 5 mg	Rat male accessory glands saline extract 30 mg	Chemically modified rat male accessory glands saline extract 13 mg

For each dose the antigen solution (0.5 ml) was emulsified with an equal volumen of incomplete Freund's adjuvant fortified with 5 mg of **M. tuberculosis** per ml. All animals were bled before treatment and when they were killed, about 2 weeks after the second injection.

* The material was coupled to diazonium derivatives of sulphanilic and arsanilic acid according to Yantorno et al [18].

Results and discussion

A preliminary group of rats was immunized with 10 mg of accesory glands saline extract incorporated to complete Freund's adjuvant following previous work done in rabbits [19]. As the treatment was unable to induce humoral autoimmune response in this species, immunization procedures described by Hughes and Stedronska [4], Patterson and Bell [7] and other authors [10, 13] to obtain humoral autoimmune response were examined.

In the present paper, combined different priming and challenging doses of accessory glands were assayed in 64 adult male and female Wistar rats separated into three experimental groups. For group III accessory glands were chemically modified since a previous work demonstrated that this treatment enhances its immunogenicity [16].

All sera samples were tested using hemagglutination of red blood cells coated with native or modified accessory glands extract. The distribution of results is presented in Figure 1. The higher incidence of positivity and titres of antibodies detected with modified accessory glands in relation with antibodies revealed by accessory glands is very evident. This difference is statistically significant ($p < 0.0005$).

As can be seen in Figure 1, hemagglutinating activity was detected in some sera after the first immunization. A second injection was necessary to obtain a more frequent occurrence and a greater activity. The variation in the priming and challenging doses of untreated accessory glands did not modify the results (groups I and II). However, these increased significantly ($p < 0.05$) when middle doses of modified antigen were used as immunizing material (group III).

The organ specificity of the accessory glands antigens responsible for stimulating hemmaglutinating antibodies was shown by confronting rat organs saline extracts whith selected serum samples from male and female animals immunized with native accessory glands (groups I and II). Using sera from rats immunized with modified material the specificity was also confined to antigens present in the glands (Table 2) and was maintained when red blood cells were coated with modified accessory glands. Similar results were obtained when female sera were assayed. Results indicate that chemical modification in the immunizing material does not change the specificity and that it only plays an adjuvant role. In fact, the antibodies in anti-modified accessory glands sera were only specific for the native antigenic determinants of accessory glands proteins, in all cases being negative with non-related

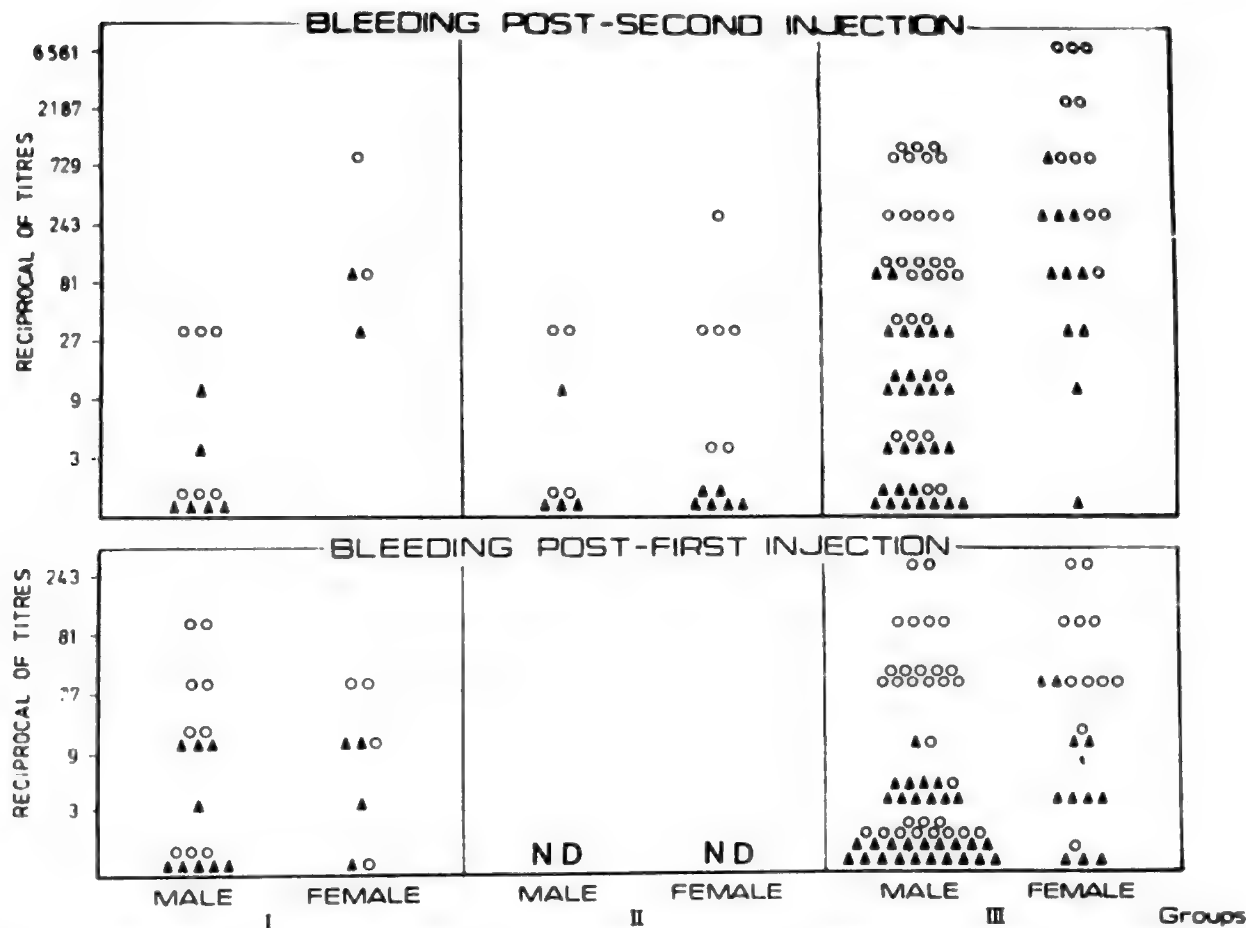


Fig. 1. — Distribution of hemagglutinating antibody titres of rat sera corresponding to bleedings post-first and post-second injection from animals of experimental groups I, II and III. Antigenic material was used at 0.1 g % protein concentration. ▲, Red blood cells coated with rat male accessory glands extract; O, Red blood cells coated with chemically modified rat male accessory glands extract; Each triangle or circle indicates one animal; N.D., Not done.

chemically modified proteins. Similar conclusions were presented by Vottero-Cima et al [16] who reported that chemical modification enables rabbit male accessory glands to induce a stronger autoimmune response as compared with untreated material. Hemagglutinating autoantibodies of all sera taken after the first and second injection were demonstrated to be 7S type when the samples were treated with 2-mercaptoethanol.

Selected sera samples from the three different groups of animals were assayed by immunodiffusion test. One line of precipitation between native material and male or female isoantisera was observed.

Homocytotropic antibodies were studied in rats of the three experimental groups. Serum samples obtained after the second immunization were assayed by PCA, using saline extract of accessory glands and modified accessory glands as challenging ma-

Table 2. — *Specificity studies*

Specimens used as inhibitors of passive hemagglutination	Red blood cells coated with	
	AG	MAG
Rat male accessory glands extract (AG)	9 *	27
Modified rat male accessory glands extract (MAG)	27	81
Rat kidney **	< 3	< 3
Guinea-pig male accessory glands extract	< 3	< 3
Rabbit male accessory glands extract	< 3	< 3
Modified rat serum ***	< 3	< 3

Inhibition of hemagglutination between serum from male rat against MAG at a dilution corresponding to 6 agglutinating units and human red cells coated with AG or MAG at 0.1 g % protein concentration.

* Reciprocal of inhibition titres.

** Liver, spleen, heart and other organs saline extracts were used.

*** Modified rabbit and human serum were also used being in all cases negative.

Inhibitors were used at an initial protein concentration of 1 g %.

terial. Ten of 39 rats showed anaphylactic autoantibodies, the incidence being quite similar in groups II and III. By contrast, these autoantibodies were not detected in rats from group I. Furthermore, the reagin-like autoantibodies were also organ and species specific with challenging material being used as different organ saline extracts from rat and other species.

In conclusion, the data presented fulfill the purpose of the work, since the induction of a specific and heterogeneous autoimmune humoral response against rat male accessory glands was obtained. The data presented show that the best immunization schedule is the one that uses modified accessory glands as antigenic material since a more frequent appearance of antibody and greater titres were obtained. Current work is directed towards the assessment of factors involved in self-recognition.

Summary

Male and female Wistar rats were isoimmunized intradermally with untreated or chemically modified male accessory glands. Most animals produced conventional and homocytotropic autoantibodies which were demonstrated to be organ and species specific. In all cases, hemagglutinating antibodies were 2-mercaptoethanol resistant. A more frequent occurrence and greater titres of antibodies were detected in sera from animals immunized with modified proteins ($p < 0.05$). The chemical modification does not change the specificity but plays an adjuvant role.

Resumen

INDUCCIÓN DE RESPUESTA AUTOINMUNE HUMORAL CONTRA GLÁNDULAS ACCESORIAS MASCULINAS DE RATA.

Ratas macho y hembra de la cepa Wistar fueron isoinmunizadas con extracto de glándulas accesorias masculinas químicamente modificadas o sin tratamiento siguiendo diferentes esquemas. La mayoría de los animales produjeron autoanticuerpos convencionales y homocitotrópicos, específicos de órgano y especie. Los anticuerpos hemaglutinantes fueron 2-ME resistentes en todos los casos. La inmunización con el material modificado permitió detectar mayor frecuencia de respuesta y título de anticuerpos más elevados ($p < 0.05$) sin cambiar la especificidad. La modificación química del material antigénico cumple un papel adyuvante.

References

1. Allison AC: Autoimmune diseases: Concepts of pathogenesis and control. *In:* Autoimmunity, Genetic, Immunologic, Virologic and Clinical Aspects (Ed) Norman Talal, Academic Press, New York, 1977, p 91.
2. Boyden SV: Adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J exp Med* 93: 107, 1951.
3. Deutsch HF, Morton JI: Dissociation of human serum macroglobulins. *Science* 125: 600, 1957.
4. Hughes RAC, Stedronska J: The susceptibility of rat strains to experimental allergic encephalomyelitis. *Immunology* 24: 879, 1973.
5. Ouchterlony O: Diffusion on gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy* 5: 1, 1958.
6. Paterson PY: Experimental Allergic Encephalomyelitis and Autoimmune Disease. *In:* Advances in Immunology (Ed) Dixon, F. J. and Humphrey, J. H. Academic Press, London, 1966, p 131.
7. Paterson PY, Bell J: Studies of induction of allergic encephalomyelitis in rats and guinea pigs without the use of Mycobacteria. *J Immunol* 89: 72, 1962.
8. Riera CM, Faillaci MG, Yantorno C: Homocytotropic autoantibodies in rabbits subjected to cryosurgery. *J Immunol* 111: 647, 1973.
9. Riera CM, Faillaci MG, Yantorno C: A comparative study on the development of rabbit male accessory glands organ-specific autoantigens. *Ann Immunol* 129C: 29, 1978.
10. Rose NR, Molotchnikoff MF, Twarog FJ: Factors affecting transfer to experimental autoimmune thyroiditis in rats. *Immunology* 24: 859, 1973.
11. Shulman S, Yantorno C, Soanes WA, Gonder MJ, Witebsky E: Studies on organ specificity. XVI. Urogenital tissue and autoantibodies. *Immunology* 10: 99, 1966.
12. Stavitsky AB: Micromethods for the study of protein and antibodies. I. Procedure and general application of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with

tannic acid and protein treated red blood cells. *J Immunol* 72: 360, 1954.

13. Twarog FJ, Kenney E, Rose NR: Adjuvants for the production of autoimmune thyroiditis in the rat. *Proc Soc exp Biol Med* 133: 185, 1970.
14. Voisin GA, Toullet F: Etude sur l'orchite aspermatogénétique autoimmune et les autoantigènes de spermatozoides chez le cobaye. *Ann Inst Pasteur* 114: 727: 1968.
15. Vottero-Cima E, Riera CM, Yantorno C: Histological localization of two different organ specific components of rabbit male accessory glands. Early postnatal development (submitted for publication).
16. Vottero-Cima E, Vides MA, Yantorno C: Humoral autoimmune response against rabbit male accessory glands elicited by untreated and chemically modified rabbit seminal plasma. *Ann Immunol* 125C: 273, 1973.
17. Vottero-Cima E, Vides MA, Shulman S, Yantorno C: Tissue specific antigens and autoantigens in the early developing male reproductive accessory glands. *Ann Immunol* 126C: 629, 1975.
18. Yantorno C, Debanne MT, Vottero-Cima E: Autoimmune orchitis induced by autoimmunization with seminal plasma in the rabbit. *J Reprod Fertil* 27: 311, 1971.
19. Yantorno C, Vottero-Cima E, Riera CM, Vides MA: Kinetics and antibody characterization of the autoimmune response to rabbit male accesory glands. *Medicina (Bs Aires)* 32: 444, 1972.
20. Yantorno C, Riera CM, Faillaci MG: Immunopathological studies on cryoimmunization of the rabbit male accessory glands. *J Path* 114: 39, 1974.
21. Yantorno C, Vottero-Cima E, Galmarini M: Experimental autoimmune damage to rabbit male accessory glands. *Invest Urol* 10: 397, 1973.

— — — —

Greater even than the greatest discovery is to keep open the way to future discoveries.

Más grande aún que el más grande descubrimiento es dejar abierto el camino a los descubrimientos futuros.

JOHN JACOB ABEL (1857-1938)
Mellon Lecture, 1915

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 354-359 (1981)

DISOCIACION AURICULAR. PARO AURICULAR UNILATERAL

E. A. J. PEYREGNE, ANA MARIA I. BUNSTER, E. G. BARRERA, J. L. MARTINEZ, L. D. SUAREZ

Sección Cardiología y Sexta Cátedra de Medicina, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires

En fecha reciente se ha insistido sobre las limitaciones del electrocardiograma (ECG) clínico o de superficie para la evaluación de las arritmias auriculares múltiples o complejas, así como sobre la necesidad de recurrir a estudios electrofisiológicos para su correcta identificación [9, 22, 25]. Ritmos auriculares dobles [5, 12], o triples [19], paros auriculares parciales [24], o unilaterales [8], y otras variedades de la denominada disociación auricular [3], son con frecuencia sólo detectados a base de hallazgos de derivaciones intracavitarias. Sin embargo, al igual que ha sucedido con los bloqueos A-V y otros tipos de arritmias [7, 11, 23], en determinadas circunstancias, los hallazgos electrofisiológicos han servido para una mejor interpretación y revaloración del ECG clínico. La observación que a continuación se detalla es una prueba más de esta afirmación.

Caso clínico

Una paciente de 84 años fue internada en el Hospital de Clínicas "José de San Martín", por haber presentado una breve crisis sincopal durante el postoperatorio de una intervención oftalmológica (glaucoma). La enferma refirió que varios años atrás le fue diagnosticado un bloqueo cardíaco completo y que su pulso oscilaba siempre entre 35 y 40 pulsaciones por minuto.

En el examen físico se comprobó esa frecuencia cardíaca, con falta de variación en la intensidad del primer ruido y desdoblamiento fijo del segundo ruido. Las yugulares mostraban ligera ingurgitación con falta de ondas "a" y de colapso sistólico.

El examen radiológico evidenció una cardiomegalia global con agrandamiento notorio de ambas cámaras auriculares. Los exámenes de laboratorio habituales, incluyendo reacciones serológicas para enfermedad de Chagas no mostraban anormalidades.

En el ECG se registró un bloqueo A-V completo con complejos QRS anchos, cuya morfología sugirió estaban originados por un ritmo idioventricular a punto de partida del tejido específico del ventrículo derecho. No se visualizaban deflexiones auriculares y sólo en largas tiras de ritmo aparecían ondas "f" de muy escaso voltaje (Fig. 1A). El ecocardiograma (modo M) registrado a nivel 4, mostró escasa o nula movilidad de la pared posterior de la aurícula izquierda. En el yugulograma, junto a ondas "c", se observó un rápido festoneo del trazado sugiriendo un pulso venoso "ondulante". Sobre la base de estos hallazgos, en especial, la escasa magnitud de las ondas "f", se formuló el diagnóstico presuntivo de fibrosis auricular con amplias áreas de paro eléctrico, asociada a una fibrilación auricular parcial.

Luego de obtenido el consentimiento, en período postabsortivo y sin medicación previa se llevó a cabo un estudio electrofisiológico con la técnica convencional [17]. Se introdujeron dos catéteres bipolares (1 cm de separación interelectródica), colocándose uno de ellos en la porción alta de la aurícula derecha en su unión con la vena cava superior (vecino al nódulo sinusal) y el otro en

— — — —

Recibido: 29-XII-1980. Aceptado: 8-IV-1981.

Dirección postal: Sexta Cátedra de Medicina, Hospital de Clínicas José de San Martín, Córdoba 2351, 1120 Buenos Aires, Argentina.

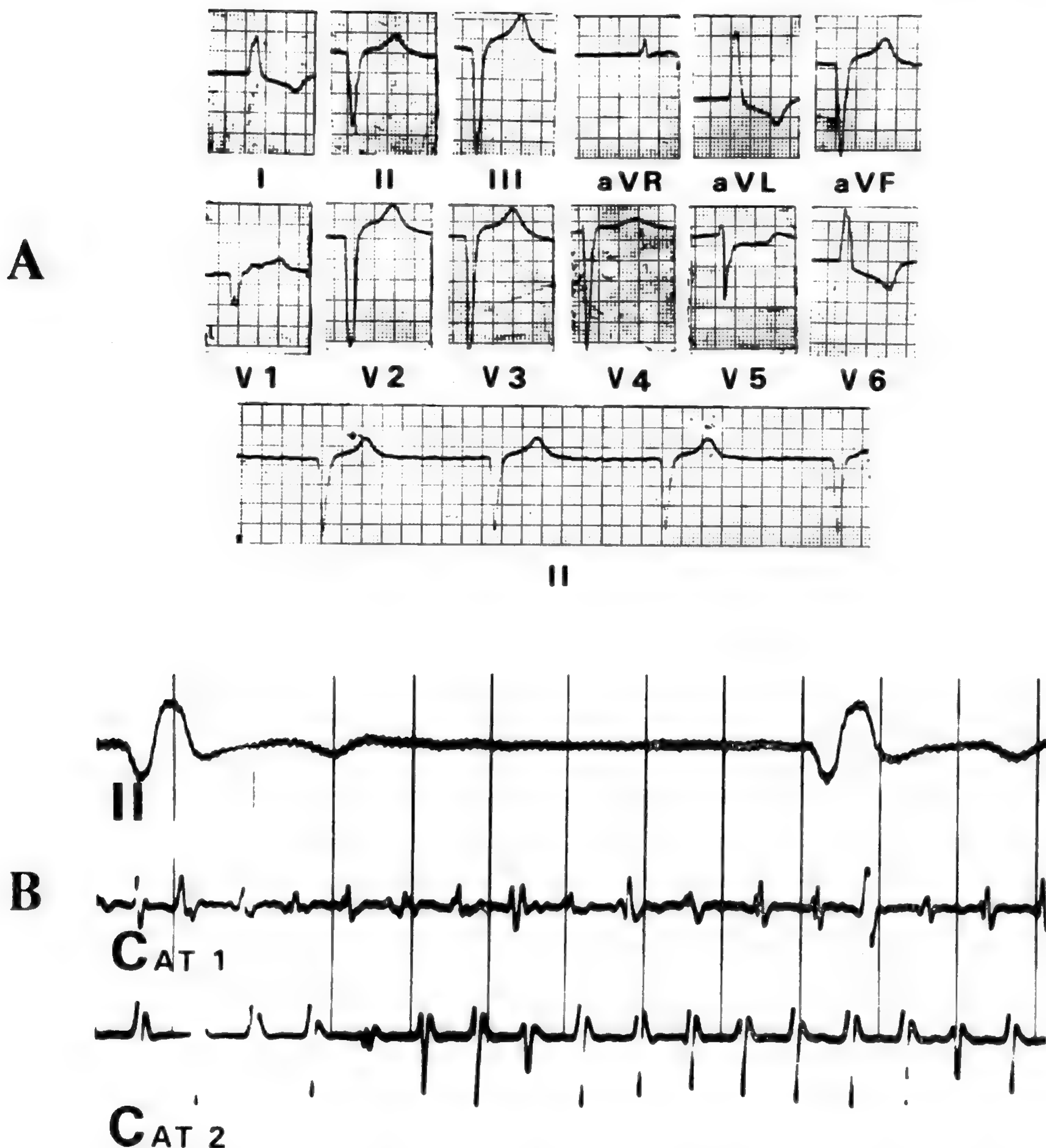


Fig. 1. — **A:** Electrocardiograma de la paciente y tira de ritmo (D2); **B:** Electrogramas filtrados (40 a 500 Hz) registrados simultáneamente con D2. La morfología del QRS de esta última, es diferente del obtenido con el ECG de superficie lo que evidencia un cambio en la ubicación del marcapasos idioventricular. El catéter ubicado en la pared libre de la aurícula derecha (catéter 1) registra potenciales auriculares con ondas de fibriloaleteo de menor voltaje que las registradas en la porción baja de la aurícula derecha (catéter 2). Velocidad de corrida del papel: 100 mm/seg. Las marcas de tiempo, separadas 0,20 seg (200 miliseg).

posición de registro del potencial hisiano. Los dos electrogramas fueron registrados en forma simultánea con la derivación de superficie D2, en un aparato Electronic for Medicine DR-8, a una velocidad de corrida del papel de 100 y 200 mm/seg y con filtros pasabandas adecuados (40-500 Hz y 4-50 Hz). Se introdujeron estímulos a frecuencias variables y desde 1 a 15 mA con un marcapasos Hewlett-Packard modelo 7804-A, con multiplicador de frecuencia.

Con el primer catéter (Fig. 1B) se obtuvieron deflexiones de muy escasa amplitud, mientras que con el colocado en la aurícula baja se registraron típicas ondas de fibriloaleteo. Estas últimas fueron también registradas cuando se desplazaba el segundo catéter por las vecindades del septum interauricular, pero se atenuaban hasta desaparecer cuando se lo ubicaba en las vecindades del nódulo sinusal (Fig. 2A). A pesar de varios intentos no pudieron registrarse potenciales hisianos, pre-

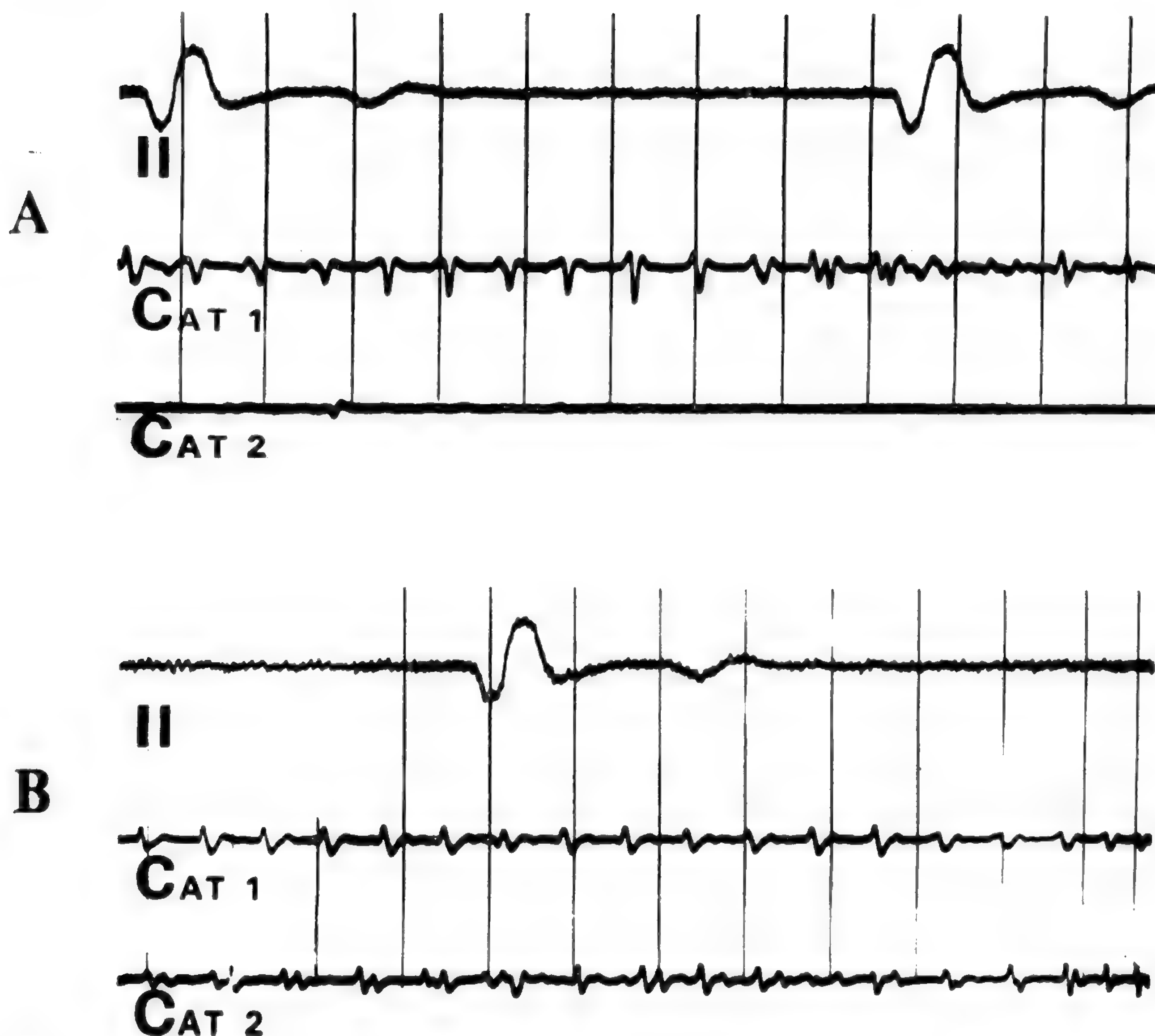


Fig. 2. — **A:** El electrograma obtenido con el catéter ubicado en la porción superior de la aurícula derecha (catéter 2) muestra falta de actividad eléctrica, mientras que el ubicado en la porción inferior de la misma registra ondas de fibriloaleteo; **B:** El catéter 2 desplazado hacia la porción inferior de la aurícula derecha a la misma altura del catéter 1 registra ahora nítidas ondas de fibriloaleteo.

sumiblemente por quedar enmarcarados por las altas y frecuentes deflexiones del fibriloaleteo [20], obtenidas en la porción baja de la aurícula derecha (Fig. 2B). En uno de esos intentos se obtuvo el pasaje del catéter a la aurícula izquierda y a la vena pulmonar superior del mismo lado, al atravesarse una válvula de Vieussens permeable. En ningún sitio de la cámara auricular izquierda pudieron registrarse deflexiones auriculares, inscribiéndose sólo ondas ventriculares de escasa amplitud, mientras que con el primer catéter desplazado entonces hacia la porción baja de la aurícula derecha, se obtenían amplias ondas de fibriloaleteo (Fig. 3A). Este último fue avanzado luego también hacia la aurícula izquierda para proceder a su marcapaseo, pero no pudo obtenerse la propagación de los estímulos, registrándose sólo las "espigas". Con posterioridad se llevó a cabo el registro continuo de la retirada de uno de los catéteres, hacia la aurícula derecha, mientras el otro era reubicado en posición de registro del haz de His, observándose la reaparición de las ondas de fibriloaleteo en el primero, no bien se atravesaba el septum interauricular, las que alcanzaban máxima amplitud cuando el extremo de éste se ubicaba en la porción inferior, cerca del segundo catéter (Fig. 3B). Se efectuó luego el marcapaseo ventricular, manifestando la enferma sentirse mejor durante el mismo. Este quedó así transitorio y 48 horas más tarde volvieron a registrarse los potenciales auriculares, con hallazgos similares a los del primer estudio. Se indicó entonces la colocación de un marcapasos permanente de implantación epicárdica, a demanda, ventrículo-inhibido.

Discusión

En esta paciente se obtuvieron evidencias certeras de paro auricular unilateral (izquierdo) de acuerdo con el criterio

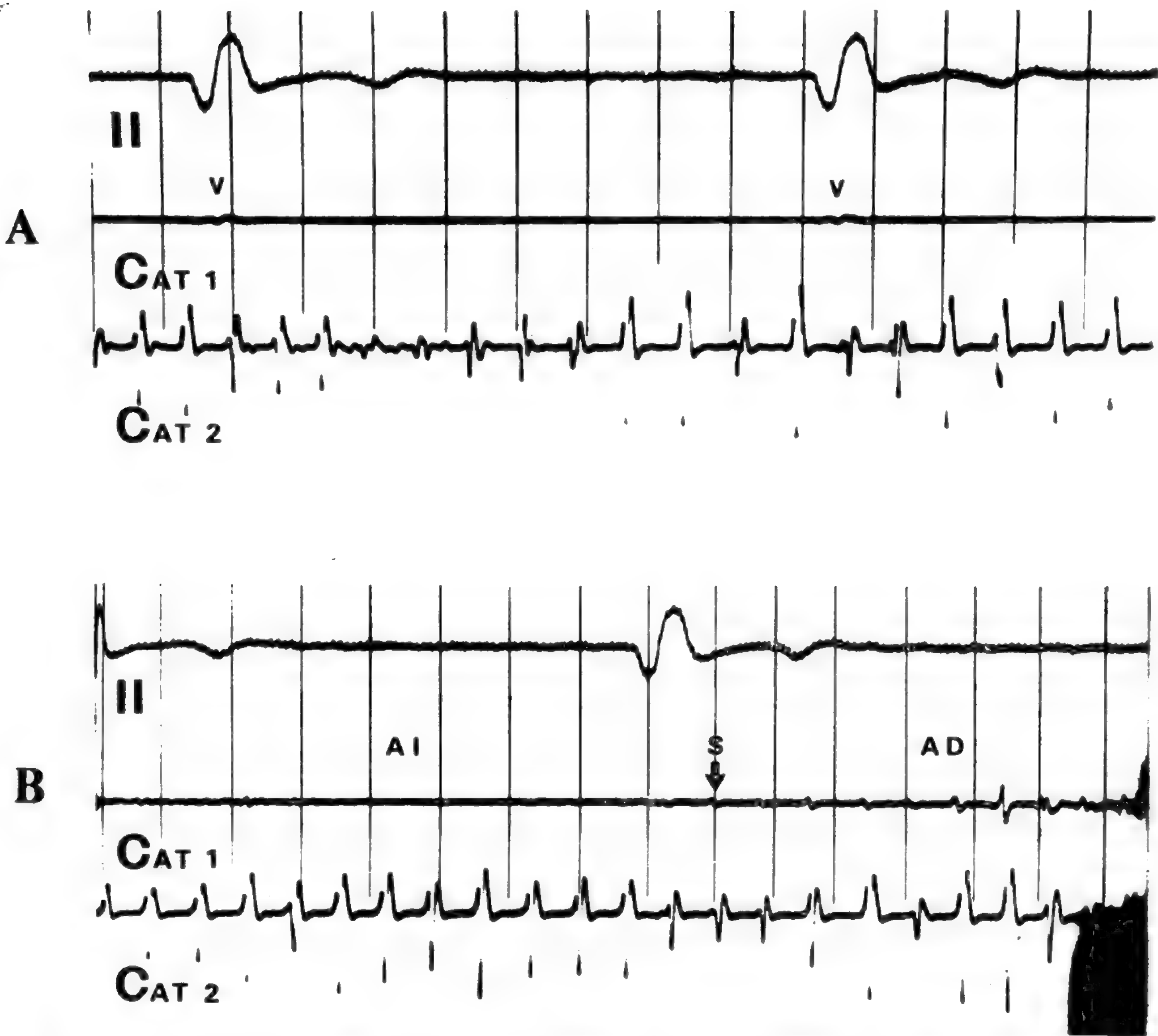


Fig. 3. — **A:** El electrograma obtenido con el catéter ubicado en aurícula izquierda no registra actividad eléctrica (catéter 1), mientras que, con el localizado en la porción inferior de la aurícula derecha se obtuvieron nítidas ondas de fibriloaleteo (catéter 2); **B:** Retirada de uno de los catéteres (catéter 1) donde se muestra, la aparición de las deflexiones auriculares no bien se atraviesa el septum interauricular (S, flecha). Velocidad de papel y escala de tiempo igual a Figura 1 (ver texto).

más difundido [21]. Además, la zona alta de la aurícula derecha mostró también una falta casi total de actividad eléctrica. De esta manera, más que una disociación interauricular [6], está presente, como ocurre con frecuencia [9, 12], una disociación auricular [19]. En ésta, existe casi siempre un ritmo dominante (en este caso un paro eléctrico) y otro localizado a un sector más o menos extenso de una de las cámaras auriculares [24, 25]. La base anatomopatológica de los paros auriculares persistentes, o parálisis auricular, es variada y motivo de controversia [8, 9]. Algunos casos corresponden a las denominadas aurículas papiráceas de no rara presentación en las valvulopatías mitrales de vieja data [13]. En otros se han comprobado miocardiopatías de diverso origen [1], vinculadas a veces a enfermedades musculares sistematizadas abiotróficas [2]. Pero, en los más, no suele ser posible descubrir causa alguna, y son consideradas parálisis o fibrosis (según los hallazgos histológicos) primitivas [8, 9, 16]. Muchas de estas últimas representan la base anatómica del denominado síndrome bradicárdico-taquicárdico [10, 16, 18]. Tampoco es rara su asociación con bloqueos A-V de alto grado [14, 19], de origen incierto, presumiblemente atribuibles a una enfermedad abiotrófica del esqueleto fi-

broso del corazón con lesión traumática del sistema de conducción [15], o una degeneración primitiva de este último [4]. Dada la falta de antecedentes cardiovasculares de nuestra enferma (excepto el pulso lento permanente), es posible asumir que tanto la parálisis auricular como el bloqueo A-V corresponden a una de estas formas primitivas o idiopáticas de cardiopatía. Sin embargo, el mayor interés de este caso radica en el hecho que el diagnóstico de paro eléctrico o fibrosis de una porción considerable del miocardio auricular fue llevado a cabo fundamentalmente sobre la base de los ECGs de superficie. Ello, por cierto, gracias a los datos aportados por los estudios electrofisiológicos de otros pacientes con hallazgos similares [9, 14, 19, 22, 24, 25]. Por lo tanto, si bien es cierto que estos últimos suelen ser indispensables para una correcta identificación de las arritmias auriculares complejas, también lo es el hecho que los mismos han contribuido de manera importante a mejorar el valor diagnóstico del ECG clínico, basado antes, sólo, o en su mayor parte, en la fertilidad imaginativa de los autores de más experiencia. Por otra parte, no hemos podido encontrar referencias de la documentación electrofisiológica de una disociación auricular, del tipo presentado por esta paciente, en la literatura nacional.

Resumen

Se relata el caso de una paciente con bloqueo A-V completo con complejos QRS anchos y ondas "f" de muy escaso voltaje, sólo evidenciables en tiras de ritmo de larga duración. Sobre la base de las características de estas últimas se postuló la existencia de una fibrilación limitada a un sector de las aurículas, con falta de actividad eléctrica del resto del miocardio auricular. El estudio electrofisiológico demostró un fibriloaleteo de los dos tercios inferiores de la aurícula derecha y paro eléctrico en el tercio superior de esta última, así como en toda la aurícula izquierda. Al igual que ha sucedido con otras afecciones, las derivaciones intracavitarias obtenidas en este paciente, han permitido revalidar hallazgos de la electrocardiografía clínica.

Summary

ATRIAL DISSOCIATION AND LEFT SIDED ATRIAL STANDSTILL

An 84 year old woman presented a high degree AV block, wide QRS complexes and fibrilloflutter waves of very low voltage. These waves were only evident in long rhythm strips. In accordance with these findings, the existence of atrial fibrillation limited to an atrial area with lack of electrical activity in the remaining atrial myocardium was postulated. An electrophysiologic study showed wide fibrilloflutter waves in the lower portion of the right atrium, while the second catheter placed next to the interatrial septum and to the lateral wall of the right atrium recorded a decrease in amplitude of these waves (Fig. 1 B) and its disappearance while the catheter was moved to wards the sinus node (Fig. 2 A). Furthermore, one catheter was passed through a patent Vieussens valve and when placed in the left atrium it registered the absence of atrial electrical activity and low amplitude ventricular waves. The catheter placed in the lower portion of the right atrium (Fig. 3A) was then introduced into the left atrium and atrial pacing was attempted with complete inability to propagate the stimulus. The pull-back of one catheter from the left to the right atrium showed reappearance of fibrilloflutter waves when the atrial septum was passed through and they increased in amplitude when it reached the lower portion of the right atrium (Fig. 3B). As described in other cardiac arrhythmias, the intracardiac atrial electrograms obtained in this patient confirmed the findings of the surface ECG.

Bibliografía

1. Allensworth DC, Rice GJ, Lowe GW: Persistent atrial standstill in a family with myocardial disease. *Am J Med* 47: 775, 1969.
2. Baldwin BJ, Talley RC, Johnson C, Nutter DO: Permanent paralysis of the atrium in a

patient with fascioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Cardiol* 31: 649, 1973.
3. Chung EK: A reappraisal of atrial dissociation. *Am J Cardiol* 28: 111, 1971.
4. Dhingra RC, Khan A, Pouget JM, Rosen K M: Lenègre's disease in a young adult. *Am Heart J* 88: 487, 1974.
5. González Videla J: Disociación auricular con doble comando auricular. *Rev Argent Cardiol* 38: 23, 1970.
6. González Videla J: Disociaciones interauriculares. *Rev Argent Cardiol* 30: 3, 1963.
7. Gupta PK, Lichstein E, Chadda KD: Chronic His bundle block. Clinical, electrocardiographic, electrophysiological and follow-up studies on 16 patients. *Br Heart J* 38: 1343, 1976.
8. Harley A: Persistent right atrial standstill. *Br Heart J* 38: 646, 1976.
9. Leier CV, Schall SF: Dissimilar atrial rhythms. A patient with interatrial block. *Br Heart J* 39: 680, 1977.
10. Moss AJ, Davies RJ: Brady-tachy syndrome. *Prog Cardiovasc Dis* 16: 439, 1974.
11. Narula OS, Scherlag BJ, Samet P, Javier RP: Atrioventricular block. Localization and classification by His bundle recordings. *Am J Med* 50: 146, 1971.
12. Perosio AM, Suárez LD, Llera JJ: Atrial dissociation. *Am Heart J* 85: 401, 1973.
13. Raynaud R, Jobard P, Brochier M, Fauchier JP, Benatre A, Raynaud P: Paralysie auriculaire chronique et oreillette papyracée. *Annales Card et Angeiol* 17: 117, 1973.
14. Rosen KM, Rahimtoola SH, Gunnar RM, Lev M: Transient and persistent atrial standstill with His bundle lesions. Electrophysiologic and pathologic considerations. *Circulation* 44: 220, 1971.
15. Rosenbaum MB, Elizari MV, Lazzari JO: Los hemibloqueos. Ed. Paidós, Buenos Aires, 1968.
16. Rossi L: Anatomic basis of cardic arrhythmias. *In:* Befeler B, Lazzara R, Scherlag BJ (eds): Selected topics in cardiac arrhythmias. Futura Pub Co, New York, 1980, p 23.
17. Scherlag BJ, Lau SH, Helfant RH, Berkowitz WD, Stein E, Damato AN: Catheter technique for recording His bundle activity in man. *Circulation* 39: 13, 1969.
18. Slama R, Waynberger M, Motte G, Bouvrain Y: La maladie rythmique auriculaire. Etude clinique-électrique et évolutive de 43 observations. *Arch Mal Coeur* 62: 297, 1969.
19. Suárez LD, Kretz A, Alvarez JA, Martínez-Martínez JA, Perosio AM: Dissimilar atrial rhythms. *Am Heart J* 100: 628, 1980.
20. Touboul P, Clement C, Delahaye JP: L'enregistrement de l'activité électrique du faisceau de His dans le flutter et la fibrillation auriculaire. *Coeur et Méd Int* 10: 453, 1971.
21. Waldo AL, Vitikainen, KJ, Kaiser GA, Bowman FO, Malm JR: Atrial standstill secondary to atrial inexcitability (atrial quiescence). *Circulation* 46: 690, 1972.
22. Wu D, Denes P, Amat-y-Leon F, Chablani RC, Rosen KM: Limitations of the surface electrocardiograms in the diagnosis of atrial arrhythmias. *Am J Cardiol* 36: 91, 1975.
23. Wu D, Denes P, Amat-y-Leon F, Dhingra R, Wyndham CRC, Barenfeind R, Lafit P, Rosen KM: Clinical, electrocardiographic and electrophysiologic observations in patients with paroxysmal supraventricular tachycardia. *Am J Cardiol* 41: 1045, 1978.
24. Zipes DP, De Joseph RL: Dissimilar atrial rhythms in man and dog. *Am J Cardiol* 32: 618, 1973.
25. Zipes DP, Gaum WE, Genetos BC, Glassman RD, Noble RJ, Fisch Ch: Atrial tachycardia without P waves masquerading as an A-V junctional tachycardia. *Circulation* 55: 253, 1977.

— — — —

En otros tiempos, un hombre culto era aquel que conocía la cosmogonía de los presocráticos. Hoy, el hombre culto es generalmente el que sigue conociendo la cosmogonía de los presocráticos pero que ignora la de Einstein. Esta es la cruel y paradójica conclusión del avance científico. A los hombres de espíritu universal sólo les queda la melancólica añoranza de aquellos tiempos en que todavía era posible "l'uomo universale".

Ernesto Sábato

Hombres y engranajes, 1970

 ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 360-368 (1981)

ESCLERODERMATOMIOSITIS, CRISIS DE DISNEA PAROXISTICA, LIGADURA DE VENA CAVA INFERIOR, SHOCK

Z. O., 43 años, sexo femenino. H. C. Nº 51 864. Autopsia Nº 2228. Ingresó 2-VIII-79. Falleció el 18-VIII-79.

Paciente internada por primera vez en el Instituto de Investigaciones Médicas en 1978, refiriendo la aparición, en octubre de 1977, de astenia, decaimiento general y mialgias que se exacerbaban con la actividad; fiebre, edemas bipalpebrales, pérdida de fuerzas en extremidades, proximal y distal; disnea progresiva que llega a ser de mínimos esfuerzos, alopecía, fenómeno de Raynaud, caída de la cabeza hacia adelante y atrás y erupción eritematopruriginosa que dejaba como secuela áreas hiperpigmentadas. En febrero de 1978 se agrega disfagia alta para sólidos y líquidos, palpitaciones con dolor precordial opresivo y dificultad para la masticación y para la apertura bucal. Por ese motivo es atendida médicamente en Paso de los Libres, interpretándose el cuadro como miocarditis viral y es tratada con digital y diuréticos, con mejoría transitoria; por recidivar el cuadro ya descripto es derivada al IIM. A su ingreso, el 11-VII-78, presentaba atrofia muscular generalizada y extrema dificultad para realizar movimientos de cintura escapular y pelviana, disminución marcada de la entrada de aire en ambos hemitórax, con rales crepitantes y algunos roncus diseminados. En los estudios de laboratorio realizados se encontró: Urea 0.40 g %, Na 145 mEq/l, K 5.6 mEq/l, Hematocrito 50 %, Hemoglobina 15.2 g %, Leucocitos 6400 (CayN 3-Seg N 80 - Eos 1, Bas 0, Mon 4, Linfo 12), Eritrosedimentación 35 mm en la 1ª hora, Glucemia 0.60 g ‰, Fosfatasa alcalina 105 mU/ml, GOT 40 mU/ml, QPT 33 mU/ml, Acido úrico 6.4 mg %, Creatininemia 0.42 mg %, Clearance de creatinina 48.3 ml/min, Sedimento urinario con regular cantidad de hematíes y leucocituria abundante, no piuria, Calcemia 9.3 mg %, Fósforo 3.1 mg %, Bilirrubia 0.90 mg %, Colesterol 300 mg %, Creatinofosfoquinasa (CPK) 560 mU/ml, VDRL negativa, Anticuerpos antinúcleo positivos, Complemento 294 UH 50 %, LE negativo, Anticuerpos antiDNA 1/8, Látex negativo, Albúmina 3.06 g %, Globulinas 3.24 g % (α_1 0.45 - α_2 0.68 - β 0.62 - γ 1.49), Anticuerpos antitiroideos positivos 1/20. *Radiografía de tórax:* Corazón en forma y tamaño normales. Diafragmas altos y bases poco aereadas. *Tránsito esofágico:* con rigidez de las paredes, estómago y duodeno normales. *Vesícula biliar:* normal. *Pielografía:* normal. *Electrocardiogramas* Taquicardia sinusal. Bajo voltaje generalizado. Eje a 90°. Cambios primarios de la repolarización. *Electromiograma:* Proceso miosítico. *Examen funcional respiratorio:* Incapacidad ventilatoria mixta severa, no reversible con broncodilatadores. Leve aumento de resistencia de pequeña vía aérea [CV 1.40 l (41 %) - CVF 1.40 l (41 %) - FEV 1 1.10 l (40 %) - FEV 1 % (78 %) - FeF 25-75 (32 %)]. *Biopsia muscular:* Atrofia muscular.

Evolución: Se interpretó el cuadro como una esclerodermatomiositis comenzando el tratamiento con metilprednisona 60 mg por día y kinesioterapia. La paciente mostró progresiva mejoría clínica y de laboratorio, con disminución de los valores enzimáticos (CPK 47) y progresiva recuperación de la motilidad y del examen funcional respiratorio. Tres semanas antes del alta presentó un episodio de disnea súbita, con dolor en hipocondrio derecho y base de hemitórax del mismo lado. Se interpretó el cuadro como tromboembolismo pulmonar, realizándose una angioneumografía que mostró falta de relleno en arteria terciaria basal izquierda. Fue medicada con heparina y luego con anticoagulantes orales siendo dada de alta de la sala, continuando el tratamiento con prednisona 40 mg por día y Sintrom ® como anticoagulante. Permaneció asintomática, en buen estado general hasta julio de 1979, cuando aparece disnea paroxística, tos, taquicardia y precordialgia de aparición brusca, con duración de algunas horas, varias veces en el día. Este dolor se irradiaba a espalda, brazo izquierdo y cuello calmando con la administración de vasodilatadores. Posteriormente se agrega hipotensión arterial y es internada en Paso de los Libres siendo medicada con hidratación parenteral y digoxina, apareciendo edemas en cara, manos y miembros inferiores, siendo derivada nuevamente al IIM.

A su ingreso, en su *segunda internación (2-VIII-79)*, se comprueba la presencia de edemas en miembros inferiores 4/6 y bipalpebrales, presión arterial 150/100 y 180/120. Disminución de la entrada de aire en base derecha. Auscul-

— — — —

Reunión anatomoclínica efectuada en el Instituto de Investigaciones Médicas del 9-V-1980. Editores: Dres. M. A. Castro Ríos y H. J. Delisio.

tación cardíaca con ruidos alejados y soplo sistólico 2/6 en base y punta. No se palpaba hígado, ni bazo. Fondo de ojo normal.

Los estudios de laboratorio: Hematocrito 54 %, Eritrosedimentación 2 mm en la 1ª hora, Glucemia 0.66 g ‰, Leucocitos 6100 (CayN 1 - Seg N 79 - Eos 1 - Bas 0 - Mon 4 - Linfo 15), Sedimento urinario proteinuria 0.40 g %, no hay cilindros ni hematíes; Urea 0.50 g %, Quick 45 %, PTTK 60.4 seg, Complemento 222 UH 50 %, LE negativo, Albúmina 3.03 g %, Globulinas 2.67 g % (α_1 0.39 - α_2 0.57 - β 0.39 - γ 1.32), Creatina 1 mg %, Clearance de creatinina 33.6 ml/min, CPK 45, Aldolasa 1.8 mU/ml, Antinúcleo negativo. *R. tórax:* Corazón moderadamente agrandado, pulmones normales. *ECG:* Eje 120°, probable hipertrofia ventricular izquierda y biauricular extrasistolia supraventricular. *Examen funcional respiratorio:* Incapacidad ventilatoria mixta severa, no se modifica con broncodilatadores [CV 1.85 l (56 % - CVF 1.85 l (56 %) - FEV 1: 1.50 l (55 %) - FEV 1 % (81%) - FEF 25-75 1.52 (52 %)].

Evolución: El 11 de agosto desarrolla disnea brusca, angustia, taquicardia, presión arterial 200/140, sudoración, piel fría, cianosis, aparece un 3er. ruido en la auscultación cardíaca, no hay cambios en la auscultación pulmonar ni en el electrocardiograma. Se realiza centellograma de pulmón (con 99Tc) observándose múltiples áreas de hipoperfusión en ambos campos pulmonares y falta de perfusión en base de pulmón derecho. Luego del estudio presenta disnea brusca, palpitaciones y sudoración fría, con una tensión arterial de 185/150. Se coloca heparinización en goteo continuo y se administra 300 mg de diazóxido descendiendo la tensión arterial a 150/110 quedando medicada con prazosin. El 18-VIII nuevo episodio hipertensivo (170/140), se administra fentolamida 10 mg y a los 10 minutos la tensión arterial está en 140/100. Se suspende heparinización. Ese mismo día se efectúa laporatomía con ligadura de vena cava inferior por debajo de las venas renales y se liga vena úteroovárica; durante el acto quirúrgico se produce desgarro de vena cava, que es suturado. En el post-operatorio inmediato aparece intenso dolor y distensión abdominal, hipotensión, shock, fibrilación ventricular, paro cardiorrespiratorio, fallece.

Discusión radiológica

Dr. G. Mundt: En la radiografía de tórax se observa un moderado aumento del área cardíaca, que puede corresponder a dilatación de cavidades izquierdas o quizás un derrame pericárdico; los diafragmas están elevados con bases pulmonares hipoaereadas. Se realizó una angioneumografía en su primera internación por la sospecha de tromboembolismo pulmonar, donde se ve la opacificación de la aurícula derecha, del ventrículo derecho, la arteria pulmonar con sus dos ramas y una terminación un poco abrupta de la arteria pulmonar izquierda, entre el tronco y sus ramas más superficiales. La imagen, aunque no es demasiado característica, puede ser compatible con un tromboembolismo pulmonar. El estudio de esófago mostró solamente en el examen radioscópico que éste era algo atónico y con ausencia de contracciones. El estómago y duodeno no mostraron lesiones, la vesícula biliar y la pielografía fueron normales.

Discusión clínica

Dr. R. Arata: Es una paciente de 43 años de edad, que comienza con astenia, mialgias y debilidad muscular en la cintura escapular y pelviana, agregándose posteriormente síndrome de Raynaud y disfagia alta. Con una paciente con estas características uno debe tratar de encasillar el cuadro clínico dentro de las enfermedades sistémicas con polimiositis. Otra expresión importante de esta enfermedad era la existencia de cambios esclerodérmicos en miembros superiores y alrededor de la boca; esto hacía pensar en una entidad que pudiera comprometer el músculo y también la dermis. Pearson clasifica las polimiositis (PM) en 5 grupos, para tratar de identificar características clínicas de cada uno de ellos y conocer su pronóstico. El grupo 1) sería la PM típica del adulto con escaso compromiso de piel, quizás un rash atípico y sí un gran compromiso neurológico-miosítico. Esta paciente, no parece corresponder al grupo 1) dado que existen cambios dérmicos importantes y el rash no es atípico. El grupo 2) sería el típico de la dermatomiositis (DM) que tampoco tiene esta paciente, dado que presenta cambios esclerosantes en las extremidades. El tipo 3) sería la (PM) asociada al cáncer. Es difícil en una paciente de esta edad, negar que tenga una neoplasia: el 8.5 % de los pacientes con PM del grupo de Pearson tenían cáncer pero ninguno tenía cambios esclerodérmicos asociados y no mejoraban con esteroides. Esta paciente, con los corticoides, mejoró la fuerza muscular con disminución de los niveles de fosfocreatinoquinasa (CPK) que estaban muy aumentados. El tipo 4)

sería la PM de los niños, y el tipo 5) es el síndrome de superposición o esclerodermatomiositis (EDM) que sí parece corresponder con el cuadro de esta enferma. No hay ninguna duda que tenía una miositis, tiene una biopsia muscular con atrofia, un electromiograma compatible con miositis, enzimas musculares elevadas y falta de fuerzas en la cintura escapular y pelviana. Existen evidencias de compromiso cardiopulmonar, y uno debe tratar de deslindar qué posibilidades tenía esta enferma de tener lesiones por su enfermedad de base o por otras enfermedades intercurrentes. Aparentemente cuando ingresó tenía un examen respiratorio normal. Durante la evolución tiene dos episodios de disnea brusca, con dolor en el hipocondrio derecho que parecen corresponder a un tromboembolismo pulmonar (TEP). Negar que tiene un TEP es difícil, porque tiene un centellograma pulmonar con áreas múltiples de hipoperfusión y una angioneumografía que sería compatible con este diagnóstico. Tenía también un ECG donde mostraba pericarditis, y algunos signos de miocardiopatía que creo son secundarios al TEP. Otro aspecto interesante quizás es el cuadro de hipertensión arterial que desarrolla; a su ingreso, estaba normotensa y en la internación alcanza cifras realmente importantes de 240 mm de máxima y 140 mm de mínima, y es conocido que estos pacientes pueden tener lesión renal e hipertensión maligna, si bien no parece ser el caso pues tiene un sedimento urinario normal salvo en uno que tiene proteinuria de 1 g/l, que creo está relacionada a insuficiencia cardíaca congestiva. Por lo tanto, sostengo la opinión de la sala que la paciente tiene un síndrome de superposición de tipo 5, que tuvo TEP a repetición múltiples, que la hipertensión arterial es quizás secundaria a exceso de catecolaminas y no a una lesión renal, que no tiene otras causas importantes que la hayan llevado a la muerte como no sea el TEP. Yo pienso que la ligadura de cava no ha tenido demasiada importancia en la hemorragia, quizás sí la hipovolemia provocada por la ligadura misma de la cava en una paciente en un estado hemodinámicamente crítico.

Dr. A. Quesada: Se trata de una polimiositis de tipo 5, que es una enfermedad generalizada y que ocasiona con frecuencia compromiso pulmonar. En esta paciente, el examen funcional respiratorio del día 14 de julio, es en mi criterio anormal, ya que la capacidad vital y la vital forzada es de 1.40 litros no representando el 41 % de lo teórico, con un FV1 de 1 litro con un porcentaje similar; y un flujo espiratorio forzado en la mitad de la capacidad vital del 32 %. De manera que previamente a la aparición de toda la secuencia de embolias pulmonares, la paciente tenía una alteración importante de su función respiratoria. Yo creo por ese motivo, que aun cuando las radiografías no muestran lesiones pulmonares, es posible que encontremos las lesiones características de esclerodermia y de la dermatomiositis, que son fibrosis pulmonar y a veces también la aparición de formaciones quísticas pequeñas de menos de 1 centímetro de diámetro que se localizan en general en la periferia del pulmón y más frecuentemente en las bases. Un mes después y durante su posterior evolución el examen de la función respiratoria mejoró, y pienso que ha sido como consecuencia del tratamiento con corticoides. Durante su evolución la paciente presentó, al mes de estar internada, un episodio de embolia pulmonar que creo que es indudable y que posteriormente fue reiterativo lo que obligó a tomar una conducta quirúrgica, que desgraciadamente fracasó y la paciente falleció. Esta paciente fue tratada con corticoides durante bastante tiempo. Está relatado el embolismo pulmonar espontáneo por movilización de grasas del hígado en los pacientes tratados crónicamente por corticoides, de manera que, si bien lo dirán los patólogos, hay que recordar la posibilidad de que cuando los pacientes son tratados durante mucho tiempo con corticoides éstos pueden movilizar las grasas depositadas en hígado, y dar embolias pulmonares [1]. Con respecto a la asociación con cáncer, aquí

1. Leevy CM: Fatty liver: A Study of 270 patients with biopsy proven fatty liver and a review of the literature. *Medicine* 41: 249, 1962.

no hay evidencias de ello y debe pensarse cuando en el curso de estas enfermedades los enfermos empeoran desmedidamente y en forma no previsible, de acuerdo al tratamiento y cuadro clínico.

Dr. H. A. Calbosa: En la primera internación estuvo, como ya se dijo, siempre normotensa; desarrolla hipertensión arterial en el curso de los primeros días de la 2ª internación. Si uno revisa la historia surgen dos posibilidades en cuanto a los mecanismos que podían estar en juego: 1) tratamiento prolongado con corticoides; 2) hipertensión secundaria a la enfermedad de base. Recién el Dr. Arata hizo algunas consideraciones que ponen en dudas que la enfermedad de base hubiera cambiado en cuanto a su participación renal, para justificar los violentos ascensos tensionales como ocurre en la crisis de esclerodermia cuando la hipertensión adquiere característica de maligna. Y además en el curso de la internación no se produce deterioro de la función renal en forma significativa. La tercera posibilidad, bastante factible, sería la excesiva descarga de catecolaminas secundaria a posibles repetidos episodios de embolismo pulmonar. A mi me tocó presenciar uno de ellos: la paciente que estaba en disnea continua, en un momento incrementa la misma pasando de una PA de 140/100 a 180/130 con buena respuesta al diazóxido y a la regitina. Esta mejoría de la presión arterial con vasodilatadores significa que existía exagerada vasoconstricción. Si también se produce con regitina se puede pensar que dicha vasoconstricción se debe a excesivo tono α simpático. En la embolia de pulmón existe descarga de catecolaminas como mecanismo compensador del bajo volumen minuto, pero difícilmente los pacientes se pongan hipertensos debido al insuficiente débito cardíaco. Si se produce hipertensión en estas circunstancias se podría presumir la existencia de supersensibilidad de receptores a las catecolaminas en forma inespecífica. Lamentablemente no se pudo dosar renina ni tampoco realizar ningún test de control que aclarara si el sistema renina angiotensina aldosterona estaba en juego. Resumiendo, los picos hipertensivos que la paciente sufrió en el curso de la segunda internación estuvieron vinculados a mayor insuficiente respiratoria secundaria a presuntos embolismos pulmonares. El mecanismo presor más importante sería dependiente de catecolaminas segregadas en respuesta al deficitario volumen minuto que el embolismo pulmonar producía. La existencia de un tumor productor de los mismos (feocromocitoma) sería una casualidad.

Dr. A. Quesada: Radiológicamente hay una saliente del arco medio de las arterias pulmonares, bastante prominente, que por supuesto puede ser debido a la hipertensión pulmonar, secundaria al embolismo, pero también quería recordar que en la esclerodermia, hay lesiones en el lecho vascular pulmonar que pueden ser causa también de estos hallazgos.

Dr. J. Marcarian: En el ecocardiograma que fue hecho en la 1ª internación se veían diámetros del ventrículo izquierdo y derecho, dentro de límites normales, hasta algo chicos, con un diámetro auricular izquierdo también dentro de límites normales y llamaba la atención una relativa hipoquinesia de pared posterior ya en el primer estudio. O sea, fue el único estudio en el momento que corresponde a la primera placa con corazón chico. Ya en ese estudio se veía un derrame pericárdico grado 1: esta efusión pericárdica crónica es un hallazgo bastante frecuente en pacientes con esta patología. Otro dato a considerar en el ecocardiograma, el único que tenemos y corresponde a la primera internación, es un segmento AC prolongado que es indicatorio de aumento de presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo. En este momento, la paciente no tenía evidencias clínicas de insuficiencia cardíaca izquierda. En la segunda internación no se pudo realizar el eco, aunque en ese momento, las características clínicas del paciente mostraban que seguramente, el ecocardiograma, estaría modificado y muy probablemente correspondería a los hallazgos de una miocardiopatía congestiva. El compromiso miocárdico de esta enfermedad generalmente es independiente de la hipertensión

pulmonar que ya fue comentada y de la hipertensión sistémica que también fue mencionada. El compromiso miocárdico en casos de esclerosis sistémica prácticamente se encuentra en el 50 % de las autopsias; la lesión característica en el 50 % de los casos estudiados es la necrosis en banda de contracción. Esta lesión se la considera una lesión de reperfusión similar a las que se pueden encontrar en las zonas adyacentes al infarto agudo de miocardio en corazones que tuvieron o que fueron sometidos a *"by-pass"* cardiopulmonar y también en forma experimental en la oclusión y reperfusión coronaria. Esto ha hecho postular un mecanismo de síndrome de Raynaud a nivel de arterias coronarias, incluso se ha descripto pacientes con electrocardiograma y dolor anginoso típico que en anatomía patológica demostraron tener arterias coronarias totalmente normales. En general, el compromiso miocárdico en esta patología, es tanto del ventrículo derecho como del ventríoulo izquierdo, que la diferenciaría en parte de la cardiopatía isquémica, aparte de la necrosis en banda de contracción ya comentada. Y en este caso las lesiones se extienden hasta el endocardio, a diferencia de la cardiopatía isquémica, que habitualmente deja una pequeña zona sub-endocárdica sin fibrosis. Por otra parte, esta enfermedad puede tomar el sistema de conducción específicamente dando distintos grados de bloqueo de rama incluso, bloqueo AV y también se ha demostrado casos de compromiso de nódulo sinusal donde se ha visto degeneración del nódulo incluso obstrucción de la arteria del nódulo, en esta paciente la secuencia electrocardiográfica que fue bastante rica en mostrar arritmias de todo tipo incluso en determinados trazados electrocardiográficos se observó compromiso auricular o intraauricular o una hipertrofia biauricular; si consideramos de valor el eco primero con aurícula chica es probable que esto sea un trastorno de conducción intraauricular y no una hipertrofia auricular aunque también la podía tener. El compromiso pericárdico en esta patología se observa en un 60 a 70 % de las autopsias y podría ser de dos tipos: una efusión pericárdica crónica o aguda. Creo que tiene muchas posibilidades de tener un TEP, incluso está descripto en la dermatomiositis la presencia de trombosis murales y en este caso pienso que si existió tromboembolismo, es muy probable que el sitio de origen sea de cavidades derechas. En definitiva, creo que hay compromiso miopericárdico, la existencia de tromboembolismo creo que es casi segura aunque hay otros mecanismos probables para explicar algunos de los episodios que pueden estar relacionados a la hipertensión arterial por fallo ventricular izquierdo. Incluso no descarto que pueda haber compromiso de nódulo sinusal por las distintas arritmias que tuvo, incluso uno de los trazados electrocardiográficos mostró extrasistoria ventricular con P sinusal disociada, posterior a la cual aparecen focos sinusales que pueden ser indicio de patología sinusal. Además si hay compromiso pericárdico también puede haber lesión de nódulo por la pericarditis.

Dr. A. Zucchini: Pienso que en una paciente que tiene el diagnóstico de un síndrome de superposición y que en el curso de su enfermedad debuta con una crisis hipertensiva, no puede descartarse que el origen de su hipertensión sean lesiones vasculares a nivel renal, que determinan sobreproducción de renina. El compromiso renal fue evidenciado durante su evolución por la presencia de microhematuria persistente y proteinuria leve, aunque ya en la última parte de su enfermedad presentaba una insuficiencia renal moderada a severa como lo demuestra el filtrado glomerular de 30 ml/min. Por lo tanto, creo que el mecanismo hipertensivo de esta paciente está originado por lesiones vasculares renales, fundamentalmente proliferación intimal, necrosis fibrinoide, y degeneración mucoide como se describe en la esclerodermia, determinando además alteraciones de tipo isquémico que justifican la disminución de la función renal que presentaba.

Dr. D. Knisnik: Quisiera preguntar al Dr. Marcarian si en el ecocardiograma se observó movimiento paradojal del septum, y en caso negativo, cuál es el porcentaje

de falsos negativos en presencia de hipertensión pulmonar comprobada.

Dr. J. Marcarian: El eco realizado en esta paciente creo que es anterior al primer episodio de tromboembolismo y en este caso el septum no fue informado porque había superposición con imágenes de costillas y no puedo ver si había movimiento paradojal del septum, en cuanto a la posibilidad de falsos positivos, en general depende de las presiones que se manejen pero por supuesto no se da en el 100 % de los casos.

Dr. D. Knisnik: El primer episodio del supuesto tromboembolismo se acompañó de severo compromiso hemodinámico no mostrando la angioneumografía imágenes compatibles con dicho diagnóstico; este estudio si bien no descarta totalmente dicha presunción lo hace con el de carácter masivo; como existían evidencias clínicas y electrocardiográficas de hipertensión pulmonar creo que la causa reside en el compromiso de las arterias pulmonares por las lesiones descriptas en la esclerodermia [2] o es secundaria a la disminución del volumen pulmonar por la fibrosis intersticial [3]. Ecocardiográficamente existían signos indirectos de aumento de la presión diastólica de fin de lleno de ventrículo izquierdo y como mencioné evidencias de insuficiencia ventricular derecha, la ligadura de la vena cava inferior produjo una aguda disminución de la precarga por debajo de lo necesario para mantener el volumen minuto desencadenando el cuadro de shock y muerte.

Dr. A. Lanari: ¿La enferma era negra?

Dr. R. Arata: No.

Dr. A. Lanari: ¿Por qué tiene entonces una eritrosedimentación de 2 mm? Cuando se encuentra 2 mm de eritrosedimentación en una persona que tiene tromboembolismo, lo que supone que hay razones para tenerla por lo menos ligeramente elevada, hay entonces que buscar las causas por las cuales la eritro está tan baja, y una de ellas podría ser, por ejemplo una anemia falciforme. Esto último no se advierte sino cuando se realizan técnicas especiales con anhídrido carbónico alto u oxígeno bajo. Es una de las cosas que al menos había que presentar como posibilidad. Y otra cosa que hay que considerar es la siguiente: se ha insistido muy poco en la miositis; se ha mencionado la atrofia muscular, lo que no es suficiente para definir una miositis. Debe haber dolor manifiesto y presentar en la biopsia no solamente atrofia muscular, ya que eso se puede encontrar en una lesión de la segunda neurona, sino que tiene que haber también lesiones del intersticio. ¿Existían o no?

Dr. R. Arata: Tenía una biopsia informada como atrofia muscular.

Dr. J. A. Barcat: No existían lesiones inflamatorias intersticiales; la descripción decía: "reemplazo de fibras por tejido adiposo", y continuaba: "atrofia salpicada de fascículos con lesiones degenerativas musculares y sin infiltración inflamatoria".

Dr. A. Lanari: Bueno, podría tratarse simplemente de una esclerodermia con participación muscular pero no una miositis. Ya se ha discutido si existía o no tromboembolismo pulmonar, por lo que no insistiré.

Dr. J. J. Podestá: Y habría que indicar también que las enzimas eran muy altas.

Dr. A. Arata: Pero habían sido obtenidas en un episodio post-isquémico.

Dr. D. Kniznik: Quería aclarar que hubiera sido muy importante la medición de presiones intracavitarias, porque en un trombolismo pulmonar masivo, en un corazón previamente sano, es excepcional que la presión en la arteria pulmonar sea mayor de 40, una presión más alta significa un tromboembolismo crónico recurrente o una hipertensión pulmonar, lla-

2. Young R, Mark GS: Pulmonary vascular changes in scleroderma. *Am J Med* 64: 998, 1978.
3. Enyon Y, Thomas HM, Bojgen CH, Wood JA, Cleroy Z, Blanc WA, Nigger HJ: Pulmonary hypertension in interstitial lung disease: Relation of vascular resistance to abnormal lung structure. *Trans Ass Am Physicians* 88: 248, 1975.

mémosla primaria entre comillas, o sea intrínseca de la vasculatura pulmonar. Por otra parte hubiera ayudado a establecer si existe presión de fin de lleno alta en el ventrículo izquierdo con el hallazgo de una presión capilar aumentada. Pienso que en este tipo de procedimientos la medición de presiones deberían ser rutinaria y hacerse en forma automática.

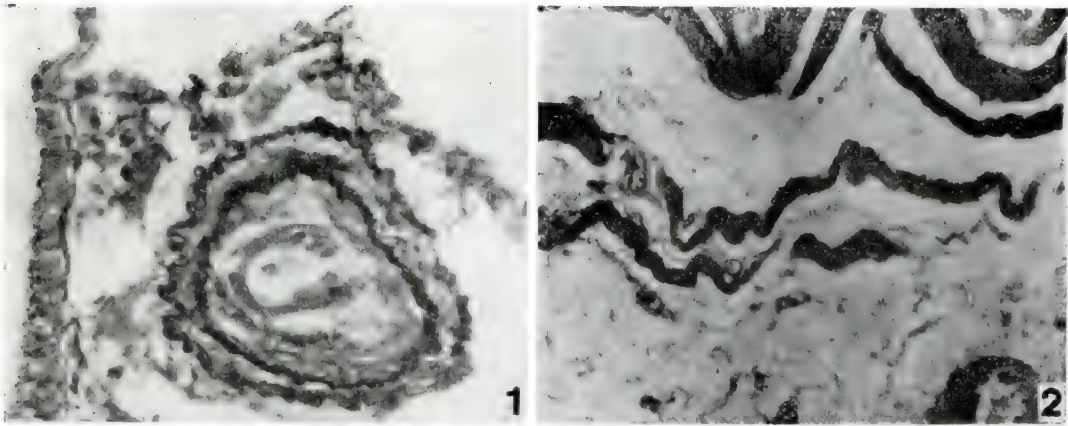
Dr. H. A. Calbosa: Prácticamente estuvo dos días con disnea continua, con ortopnea, cianosis periférica, sensación subjetiva de sed de aire, estaba en una situación donde uno hace diagnóstico diferencial de edema agudo de pulmón y embolia de pulmón recurrente. Pero lo que fue significativo, y eso lo pudimos comprobar, era que de una situación de disnea mediana que permitía al menos contestar algunas preguntas que uno le hacía, pasaba a violentas crisis, donde prácticamente no podía seguir el interrogatorio y a los 10 o 15 minutos se ponía francamente hipertensa. Esa respuesta (no nos queda muy claro la respuesta a los bloqueantes alfa) no es una cosa absoluta, pero parecería ser que las catecolaminas las tenía altas, concepto ya aclarado. Ahora, si había otro mecanismo de base que generara la hipertensión era probable, pero es difícil deducirlo por la historia clínica.

Discusión anatomopatológica

Dra. Clarisa Alvarez: La autopsia mostró que el corazón pesaba 420 g, con ligera dilatación de las cavidades cardíacas. El ventrículo derecho medía 3 mm y el ventrículo izquierdo 14 mm de grosor. No había pericarditis ni derrame pericárdico. Histológicamente se vio miocardiofibrosis difusa con múltiples cicatrices focales con la particularidad que llegaban hasta el endocardio, es decir, no había una franja de miocardio sano subendocárdico como se ve en las cardiopatías isquémicas. Por lo tanto pensamos que corresponden a secuelas de necrosis en banda de contracción como se describe en la esclerodermia y cuya patogenia sería una lesión de reperfusión [4]. Macroscópicamente en los pulmones nos impresionó el estado de la arteria pulmonar y sus ramas, similar a la aorta, con una llamativa arterioesclerosis. No se encontró tromboembolismo pulmonar. Solamente en una arteria lobar se vio una placa de ateroma que es difícil asegurar si fue un trombo antiguo, que en el momento actual ya estaba incorporado a la pared. Histológicamente encontramos una neumonitis intersticial incipiente con engrosamientos de los septas por edema o hiperplasia del revestimiento alveolar, sería el estadío inicial de la fibrosis pulmonar. Los vasos de pequeño y mediano calibre mostraban engrosamiento mucinoso concéntrico de la íntima con oclusión vascular (Fig. 1). El hígado pesaba 1100 g y presentaba necrosis centrolobulillar, como se ve en el shock. El bazo tenía tamaño y forma conservada. Las arterias peniciladas mostraban disposición concéntrica del colágeno adventicial, que también se vio en otros vasos, por ejemplo en el miocardio. En el tubo digestivo sólo presentó lesión el esófago, que mostraba en el tercio inferior fibrosis de la submucosa y de la muscularis mucosae; probablemente esto explique la disfagia. Los riñones pesaban 150 g cada uno y la superficie externa era granular. No se vio lesión glomerular significativa. Las arterias interlobulillares y arteriolas mostraban engrosamiento mucinoso de la íntima con oclusión vascular. Las arterias de mayor calibre no mostraban alteraciones. El músculo que estudiamos en la autopsia fue el diafragma, que presentaba menor lesión aún que la biopsia. Se vio un músculo con atrofia de fibras, con pérdida de las estriaciones, aumento de los núcleos sarcolemales, diferencia de tamaño entre las fibras y reemplazo por tejido adiposo (Fig. 2). No había componente miosítico, no había inflamación. Hay que tener en cuenta que la paciente estaba recibiendo corticoides y que suele verse esta discordancia entre los datos clínicos (electromiograma y enzimas) y la histología del

---

4. Bulkley B, Ridolfi R, Salyer W, Hutchins G: Myocardial lesions of Progressive Systemic Sclerosis. A cause of cardiac dysfunction. *Circulation* 58: 484, 1976.



Figs. 1-2: 1, Engrosamiento mucinoso de la íntima; 2, Cambios degenerativos del músculo esquelético.

músculo, y esto no invalida el diagnóstico de polimiositis. En resumen, se trata de una paciente que tiene enfermedad muscular caracterizada por datos clínicos y biopsia de músculo y además tiene una enfermedad del tejido conectivo que corresponde a una esclerodermia; por lo que a estos pacientes se los ha incluido en el Grupo V de la clasificación de Pearson, Poliomiositis o Dermatomiositis con enfermedad del tejido conectivo (Síndrome de superposición)[5]. La causa de muerte se debió a un shock hipovolémico por desgarro de la vena uteroovárica izquierda con un gran hematoma retroperitoneal izquierdo que comprometía el riñón y uréter izquierdo, el tejido peripancreático y parte del epiplón mayor. La vena cava estaba ligada y en perfectas condiciones.

Dr. J. A. Barcat: Nos hicimos tantas preguntas como ustedes y pensamos que nos ayudarán a contestarlas. En este caso tenemos el problema de su clasificación; aquí en la historia clínica, han puesto que se trata de una PM tipo 5, síndrome de superposición, esclerodermia con DM o con PM. Este caso es una esclerodermia que tiene una PM, pero una miositis sin reacción inflamatoria. ¿Cómo lo resolvemos? Con las lesiones pulmonares nos planteamos también preguntas, habían muchas evidencias clínicas de TEP, nosotros no encontramos TEP sino lesiones ateroscleróticas de las ramas grandes, que podrían ser consecuencia de TEP, pero también consecuencia de hipertensión pulmonar. Ahora ¿cuál es la causa de hipertensión pulmonar? No las lesiones de las arterias grandes sino un factor, tal vez el mismo que produjo el fenómeno de Raynaud en el pulmón. El Dr. Calbosa describió que las crisis de disnea eran paroxísticas y las lesiones de las arterias pequeñas pueden ser consecuencia de una vasoconstricción. Hemos encontrado a la esclerodermia en un estadío anatómico que tal vez no se describa porque los enfermos están vivos cuando esto ocurre, y aquí un accidente nos ha permitido ver una enfermedad con lesiones anatómicas de comienzo.

Dr. D. Kniznik: Con respecto a los episodios de disnea brusca en un paciente con una capacidad vital de un litro y medio, los factores que pueden desencadenar un episodio de disnea pueden ser mínimos, no es un paciente sano en un postoperatorio que comienza con disnea brusca, ésta tiene una patología bien evidente. Porque la restricción, el engrosamiento alveolar y la fibrosis, son mínimos, no la justifican. El compromiso de la pared torácica pienso que podría ser una explicación, otra explicación es lo que se observa en las hipertensiones pulmonares prima-

---

5. Bohan A, Peter JB, Bownau RL, Pearson CM: A computer-assisted analysis of 153 patients with polymyositis and dermatomyositis. *Medicine* 56: 255, 1977.

rias que es una restricción, una incapacidad restrictiva pero con otra característica: los flujos espiratorios forzados 25/75 son bajos, y éstos eran más o menos proporcionales a la capacidad vital, como si fuera puramente restrictiva. Yo, sin estar seguro, creería que es por fenómenos de la pared torácica.

Dr. A. Lanari: ¿Tenía lesiones de esclerodermia en la pared del tórax?

Dr. R. Arata: No, tenía en manos y en boca.

Dr. J. A. Barcat: Un músculo del tórax puede ser el responsable. El diafragma tiene lesiones. Nosotros nos habíamos preguntado también si la hipoperfusión que se veía en la angiografía podía deberse a un fenómeno espástico, no oclusivo, excepto la de la zona inferior que es claramente por lesión anatómica.

Dra. Clarisa Alvarez: Con respecto al músculo, Pearson en su artículo, ve esa disociación, y según ellos, en sus 153 casos encontraron más fenómenos degenerativos que inflamatorios.

Dr. J. A. Barcat: Es un mal nombre el de polimiositis.

Dra. Clarisa Alvarez: Probablemente se mantenga simplemente el nombre pero ellos encuentran más frecuentemente degeneración de fibras que inflamación, y le dan más valor a las enzimas y al cuadro clínico.

Dr. R. Arata: Lo que Pearson pone como criterios para aceptar que alguien tenga polimiositis son: mialgias, compromiso muscular de cintura escapular y pelviana, electromiograma compatible, enzimas altas —la enferma tenía 700 U de CPK— y que tenga biopsia, con buena compatibilidad. Tres criterios de los cuatro son suficientes.

Dra. Clarisa Alvarez: El componente miosítico inflamatorio lo vieron más frecuentemente en la infancia y en los casos asociados con cáncer, pero en el resto de los grupos predominaban los fenómenos degenerativos.

Dr. A. Lanari: Una observación: ya desde hace mucho tiempo, desde hace 20 años, en los enfermos que tenían artritis reumatoidea, esclerodermia, etc., se encontraban atrofias musculares muy netas, nadie decía que eran miositis, se decía atrofia muscular que acompaña a tal enfermedad o tal otra. Cuando uno dice miositis tiene que tener un componente inflamatorio manifiesto. Yo creo que puede haber una atrofia muscular como aparentemente la había acá en este caso, pero creo que hay que ser preciso en la nomenclatura y decir miositis cuando hay un proceso inflamatorio, celular, intersticial, etc., o cuando uno ve al final todo un proceso que deja entonces una esclerosis.

Dr. J. J. Podestá: Acá hubo por lo menos una miopatía, algo que puede llamarse así, incluso la enferma mejoró con corticoides. Aumentó su fuerza y trofismo muscular y mejoró notablemente el examen funcional respiratorio; eso, creo, es un argumento más a favor de que había compromiso muscular torácico.

Diagnóstico anatómico

Antecedente de ligadura de vena cava inferior.

1) *Esclerosis sistémica progresiva con cambios degenerativos musculares. Lesiones en esófago, miocardio, pulmón y riñón. Arterioesclerosis de la pulmonar. Fibrosis pulmonar incipiente. Atrofia de músculo esquelético (Bº 22 981). Hematoma retroperitoneal izquierdo por desgarro traumático de la vena uteroovárica. Necrosis hepática centrolobulillar.*

2) *Ateromatosis moderada de aorta y ramas. Pielonefritis crónica. Adenoma de paratiroides.*

 ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 369-372 (1981)

ACTIVIDAD ANGIOGENICA Y TUMOR

MARTA MIGUEZ *, LILIA DAVEL **, EUGENIA SACERDOTE DE LUSTIG ***

Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La capacidad de crecimiento de un tumor sólido hasta un diámetro crítico, así como el desprendimiento de células tumorales que se dirigen hacia zonas distantes y su posterior colonización (metástasis) dependen, entre otros factores, del establecimiento de una adecuada irrigación sanguínea. Glenn H. Algire, en 1945, fue el primero en observar que el crecimiento tumoral involucra el desarrollo de nuevos capilares desde los tejidos vecinos al tumor. Este proceso se conoce, desde entonces, como angiogénesis tumoral [1]. En 1960, Judah Folkman y Frederick Becker perfundieron pequeños órganos en cámaras de vidrio y los inocularon con células tumorales para estudiar la fase temprana del crecimiento neoplásico. De esta forma pudieron observar periódica y continuamente el desarrollo del tumor. Dentro de las cámaras, los tumores sólo alcanzaron un diámetro menor de 2 mm, pues en el órgano aislado la perfusión provoca daños en los vasos sanguíneos. Concluyeron, entonces, que la ausencia de vascularización limita el crecimiento neoplásico, ya que los tumores crecieron rápidamente cuando se implantaron in vivo [9]. En 1968, Shubik y Melvin Greenblatt observaron que una sustancia que difunde desde el tumor produce la vascularización de los tejidos vecinos [15]. En 1971, Folkman logró aislar el factor responsable de la angiogénesis tumoral a partir de una gran variedad de tumores (carcinoma de Walker 256 de rata, melanoma B16 de ratón, neuroblastoma humano, hepatoblastoma), pero no de tejidos normales y embrionarios. Dicho factor se denomina factor angiogénico tumoral (TAF) [10].

Bioensayos

Las técnicas empleadas para la detección de la actividad angiogénica son cualitativas y cuantitativas. Las primeras se llevan a cabo en distintos sistemas: saco aéreo dorsal de rata [10, 19], membrana corioalantoidea de embrión de pollo (MCA) [12, 20], córnea de conejo [13, 22] y cultivo de células endoteliales, excepto las obtenidas de vasos de cordón umbilical [2, 23]. Recientemente se desarrollaron dos técnicas para la cuantificación del TAF, una técnica radioinmunométrica (RIMA) y un radioinmunoensayo (RIA) [25].

Aislamiento

Folkman, en 1971, obtuvo un extracto semipurificado de TAF a partir de un tumor de rata. De las células extraídas separó el citoplasma, el cual fue deslipidizado, tratado con tripsina y fraccionado en Sephadex G-100 [10]. Esta técnica fue modificada posteriormente, evitando la tripsinización [19], ya que el extracto crudo

---

Recibido: 23-XII-1980. Aceptado: 11-III-1981.

* Becaria del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Miembro de la Carrera del Técnico, CONICET.

*** Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET.

Dirección postal: Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Av. San Martín 5481, 1417 Buenos Aires, Argentina.

de TAF posee actividad proteásica. La fracción nuclear de células tumorales posee actividad angiogénica, la cual está asociada a proteínas no histónicas. Dada la complejidad de la técnica, esta fracción se descarta en el proceso de extracción de TAF[27]. Otro método de extracción de TAF fue desarrollado a partir de células que crecen en cultivo, eliminando el medio de crecimiento y reemplazándolo por solución Ringer-Lactato, hacia el cual pasa el factor angiogénico[17]. El factor angiogénico aislado de un extracto tumoral o a partir de células que crecen en cultivo fue utilizado por Philips en 1979, para obtener un antisuero xenogeneico. La especificidad del antisuero se determinó in vitro por inmunoelectroforesis, doble difusión en placa (Outcherlony), inmunofluorescencia indirecta, e in vivo por neutralización del TAF en MCA y en el saco aéreo dorsal de rata[20].

En nuestro laboratorio aislamos un factor angiogénico tumoral a partir de un adenocarcinoma mamario espontáneo de ratones de la cepa BALB/c, introduciendo algunas modificaciones al esquema original de Folkman. Obtuvimos, sin embargo, mayor actividad angiogénica cuando utilizamos el cultivo de células tumorales como fuente de TAF.

Weiss, en 1979, aisló un compuesto de muy bajo peso molecular (200 daltons), altamente activo, usando TAF crudo y anticuerpo anti-TAF. Los distintos pasos en la purificación consistieron en sucesivas cromatografías en columnas de intercambio iónico, de afinidad y de filtración en gel[19].

Caracterización bioquímica del TAF

El factor angiogénico induce la síntesis de ADN entre las 8 y 10 horas de inoculado. La proliferación de capilares desde venas pequeñas se produce dentro de las 48 horas, este proceso no está acompañado por inflamación. La distancia de acción es de 3 a 5 mm desde la zona de inoculación, no existiendo actividad angiogénica en la zona necrótica del tumor. El tratamiento de los tumores con rayos X en dosis tales que se inhiba la división celular, no altera la producción de TAF, lo que indica que éste se sintetiza independientemente del ritmo de división de las células tumorales. El TAF no produce un cambio irreversible sobre el endotelio de los capilares, ya que si se lo elimina del medio desaparecen los capilares recientemente formados[10]. El factor angiogénico aislado por Folkman en 1971 presenta las siguientes características: está compuesto por 25 % de ARN, 50 % de hidratos de carbono, 15 % de proteínas y pequeñas cantidades de lípidos. Su peso molecular es de aproximadamente 10^5 daltons. Es sensible a temperaturas mayores de 56° C durante una hora, a la ribonucleasa (45 minutos a 37° C) y a la subtilisina (1 hora a 37° C). Resiste el tratamiento prolongado con tripsina. A temperatura ambiente es estable durante 72 horas y a 4° C por más de tres semanas; previo a la deslipidización mantiene su actividad por tres meses a 4° C. La composición química del TAF de bajo peso molecular (200 daltons) no se conoce aún. Se sabe que no está constituido por aminoácidos, purinas, pirimidinas, ni es una prostaglandina[28] y que necesita de un sustrato de colágeno para estimular el crecimiento de células endoteliales in vitro[23]. El TAF crudo (PM = 10^5), en cambio, promueve la proliferación de los cultivos de células endoteliales sobre un sustrato de plástico o de colágeno.

Actividad angiogénica de distintos orígenes

La neovascularización se observa no sólo en neoplasias, sino también en otro tipo de enfermedades tales como psoriasis, diabetes y tracoma. Aun no se conoce la relación entre los distintos factores angiogénicos que intervienen en estos casos. El líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoidea, espondilitis anquilosante y osteoartritis posee un factor angiogénico de características idénticas a las del TAF[5].

La angiogénesis puede ser inducida por linfocitos y macrófagos activados[21]. Auerbach observó que la inoculación de células inmunocompetentes alogeneicas y singeneicas provoca una respuesta vascular de apariencia similar a la producida por células tumorales y denominó a este proceso LIA (angiogénesis inducida por linfoci-

tos) para diferenciarla del TIA (angiogénesis inducida por tumor). Propone además que la actividad angiogénica que Folkman encuentra en placenta se debería a la presencia de linfocitos maternos sensibilizados contra los antígenos fetales[3]. Ya que TAF significa factor angiogénico tumoral, se propuso el nombre de ESAF *(endothelial cell-stimulating angiogenesis factor)* para todo factor inductor de angiogénesis, independizándose así de la fuente de origen[24].

Utilidad como diagnóstico precoz

La capacidad angiogénica se adquiere antes de que una población celular haya constituido un tumor clínicamente evidente. Diversos trabajos sugieren que la producción de un factor angiogénico sería un evento temprano en el proceso de transformación neoplásica[16].

Ciertos tumores como retinoblastoma, melanoma coroidal, melanoma del cuerpo ciliar y las metástasis en iris de carcinoma de mama, elaboran un factor angiogénico que puede ser detectado en la cámara anterior del ojo. La presencia de este factor precede a la neovascularización del iris y a la aparición de células metastásicas en el humor acuoso y permite distinguir entre lesiones benignas y malignas. Esto último es de suma importancia, ya que en la práctica oftalmológica actual la decisión acerca de la terapia a seguir, ya sea enucleación del ojo, irradiación, etc., se basa únicamente en la observación visual del tumor[26].

La actividad angiogénica puede ser considerada como un marcador temprano de lesiones preneoplásicas. Se ha observado en ratones que desarrollaron carcinomas mamarios espontáneamente, que la lesión maligna es precedida por nódulos hiperplásicos. Si bien no hay diferencias histológicas entre dichos nódulos, se sabe actualmente que aquellos que presentan actividad angiogénica en córnea de conejo pueden desembocar eventualmente en carcinomas.

Este modelo fue aplicado al estudio de biopsias de mama humanas, encontrándose que un alto porcentaje de lesiones preneoplásicas, tales como nódulos hiperplásicos y papilomas intraductales, presentaban actividad angiogénica, mientras que enfermedades fibrocísticas, fibroadenomas y tejido fibroso mamario eran incapaces de estimular una respuesta angiogénica positiva[4, 14].

Este tipo de ensayo podría resultar de suma utilidad para marcar la población de alto riesgo entre aquellas mujeres que presentan hiperplasia epitelial cuando son sometidas a una biopsia.

Inhibidores de la actividad angiogénica

Se ha demostrado que un tumor que se nutre sólo por difusión con el medio que lo rodea, detiene su crecimiento al alcanzar un diámetro de unos pocos milímetros, aunque el medio sea renovado frecuentemente. Si bien las células de la superficie continúan dividiéndose, las células del interior del tumor mueren y se alcanza un estado de equilibrio cuando el número de células viables es de alrededor de 10^6 Cuando el tumor es penetrado por vasos sanguíneos provenientes de tejidos vecinos, la llegada de nutrientes y eliminación de deshechos puede realizarse con mayor eficiencia, lo que permite un rápido crecimiento neoplásico[11]. El crecimiento de un tumor puede limitarse, entonces, evitando la proliferación capilar. Es por ello que, en la actualidad, los esfuerzos se hallan orientados hacia la búsqueda de inhibición de la actividad angiogénica. Así, por ejemplo, se encontró que el anticuerpo anti-TAF neutraliza directamente al factor angiogénico[20], mientras que los inhibidores extraídos de cartílago y de aorta actúan indirectamente, impidiendo el desarrollo de vasos sanguíneos[6, 7, 18]. Esta hipótesis implica que la inhibición de la angiogénesis puede controlar el crecimiento tumoral. Por esta razón se ha propuesto a la antiangiogénesis como una terapia potencial.

Bibliografía

1. Algire GH, Charkley HW: Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I: Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic implants. *J Natl Cancer Inst* 6: 73, 1945.
2. Atherton A: Growth stimulation of endothelial cells by simultaneous culture with sarco-

ma 180 cells in diffusion chambers. *Cancer Res* 37: 3619, 1977.
3. Auerbach R, Kubai L: Angiogenesis induction by tumors, embryonic tissues and lymphocytes. *Cancer Res* 36: 3436, 1976.
4. Brem SD, Lensen HM, Gullino PM: Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer* 41: 239, 1978.
5. Brown RA, Weiss JB, Tomlinson IW, Phillips P, Kumar S: Angiogenic factor from synovial fluid resembling that from tumors. *Lancet* 1: 682, 1980.
6. Einsenstein R, Sorgente N, Soble LW, Miller A, Kuettner KE: The resistance of certain tissues to invasion: penetrability of explanted tissues by vascularized mesenchyme. *Am J Pathol* 73: 765, 1973.
7. Einsenstein R, Kuettner KE: The resistance of certain tissues to invasion. III: Cartilage extracts inhibit the growth of fibroblast and endothelial cells in culture. *Am J Pathol* 81: 337, 1975.
8. Einstein R, Schumacher BS: Growth regulators in connective tissue. Systemic administration of an aortic extract inhibits tumor growth in mice. *Am J Pathol* 91: 1, 1978.
9. Folkman J, Cole P, Zimmerman S: Tumor behavior in isolated perfused organs. *Ann Surg* 164: 491, 1966.
10. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G: Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133: 275 1971.
11. Folkman J: Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182, 1971.
12. Folkman J: Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res* 34: 2109, 1974.
13. Gimbrone MA, Cotran R: Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 52: 413, 1974.
14. Gimbrone MA, Gullino PM: Neovascularization induced by intraocular xenografts of normal, preneoplastic and neoplastic mouse mammary tissues. *J Natl Cancer Inst* 56: 350, 1976.
15. Greenblatt M, Shubik P: Tumor angiogenesis transfilter diffusion studies in the hamster by transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 41: 1111, 1968.
16. Kumar S: Angiogenesis and antiangiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 64: 683, 1980.
17. Klagsburn M, Folkman J: Angiogenic activity in cells grown in tissue culture. *Cancer Res* 36: 110, 1976.
18. Langer R, Brem H, Falterman K, Klein M, Folkman J: Isolation of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularization. *Science* 193: 70, 1976.
19. Phillips P, Kumar S: Tumor angiogenesis factor (TAF) in human and animal tumors. *Int J Cancer* 17: 549, 1976.
20. Phillips P, Kumar S: Tumor angiogenesis factor (TAF) and its neutralisation by a xenogeneic antiserum. *Int J Canc* 23: 82, 1979.
21. Polverini P, Cotran R, Gimbrone MA, Unanue ER: Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269: 804, 1977.
22. Ryu S, Albert DM: Evaluation of tumor angiogenesis factor with the rabbit cornea model. *Inv Opht Viss Sci* 18: 831, 1979.
23. Schor AM, Schor ST, Kumar S: Importance of a collagen substratum for stimulation of capillary endothelial cell proliferation by tumor angiogenic factor. *Int J Cancer* 24: 225, 1979.
24. Schor AM, Schor SL, Weiss IB, Brown RA, Kunar S, Phillips P: Stimulation by a low-molecular-weight angiogenic factor of capillary endothelial cells in culture. *Br J Cancer* 41: 790, 1980.
25. Schor AM, Kumar S, Phillips P: Quantitation of extracts containing tumor angiogenic factor (TAF) by radioimmunometric and radioimmunoassays. *Int J Cancer* 25: 773, 1980.
26. Tapper D, Langer R, Bellows R, Folkman J: Angiogenesis capacity as a diagnostic marker for human eye tumors. *Surgery* 86: 36, 1979.
27. Tuan D, Smith S, Folkman J, Merler E: Isolation of the non histone proteins of rat Walker carcinoma 256. Their association with tumor angiogenesis. *Biochemistry* 12: 3159, 1973.
28. Weiss JB, Brown BA, Kumar S, Phillips P: An angiogenic factor isolated from tumors: a potent low-molecular-weight compound. *Br J Cancer* 40: 493, 1979.

ARTICULO ESPECIAL

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 373-377 (1981)

LA ENFERMEDAD CARDIACA DE GUSTAV MAHLER

H. O. ALONSO

Hospital Británico, Rosario

A medianoche noté
con temor los latidos
de mi corazón;
un único pulso de dolor
me apenó, a medianoche.

A medianoche, Lieder de Mahler
(sobre texto de F. Rückert).

Por distintos motivos, muchos aspectos de la vida y la obra del compositor austríaco Gustav Mahler (1860-1911) han sido mal comprendidos, y su salud, o su falta, no escapa a esta regla. Fue y sigue siendo objeto de informaciones contradictorias o equívocas y juicios insostenibles, pese a que los hechos básicos parecen ahora claramente establecidos. Más importante, no es difícil de advertir la trascendencia, acaso decisiva, que pudo tener en los lineamientos fundamentales de su vida, y en los aspectos más característicos de su extensa obra. Mientras que en muchos casos incursionar en las enfermedades de los grandes hombres puede parecer una ociosa curiosidad proclive al exceso interpretativo (particularmente notoria en la actual moda de la psicohistoria) en el caso de Mahler el estudio de su "historia clínica" parece mostrar una línea coherente de sucesos y tendencias que habrían de llevar, inexorablemente, a una muerte precoz. Aclarar las aludidas confusiones y establecer esta línea, es el fin de estas páginas.

La historia de la enfermedad cardíaca de Mahler, tal como puede ser recogida en las breves referencias de la discografía moderna, es curiosa, dramática y, desde el punto de vista médico, ambigua. Resumiendo, suele ser narrada así: en 1907, un año particularmente desgraciado en la vida del compositor, su hija mayor María enferma agudamente en la casa de descanso de la familia en Maiiernig y muere en pocos días, según algunas fuentes, de escarlatina, según otras de difteria. o de ambas. Su esposa, Alma, experimenta pocos días después un desmayo y un "médico de campo", Blumenthal, es llamado a atenderla. Por bromear, o por tranquilizarla, Mahler le pide al médico que lo examine también a él. En ese examen casual surge, imprevistamente, el diagnóstico de una enfermedad cardíaca, mortal a breve plazo. Las notas no aclaran la naturaleza de la enfermedad; algunas mencionan una angina de pecho, otras hacen referencia a una "angina de pecho complicada con una virosis e infección de la sangre" como causa de muerte. Como quiera que sea, Mahler cumple obedientemente con el pronóstico de sus médicos, falleciendo de una enfermedad cardíaca en mayo de 1911.

Ahora bien, cualquiera está en condiciones de advertir que estas breves referencias médicas son difícilmente aceptables. Es necesario dirigirse a los estudios más completos sobre el compositor y a los recuerdos de su esposa para encontrar la verdadera enfermedad de Mahler y, al mismo tiempo, una terrible historia en la que desde mucho antes que la enfermedad se presentara, la muerte es una presencia constante e inescapable.

Recibido: 8-IV-1981. Aceptado: 6-V-1981.

Dirección postal: Hospital Británico, 2000 Rosario, Argentina.

Mahler tuvo un precoz contacto con la muerte física. Nacido en 1860 en un pueblito de la Bohemia, entonces parte del Imperio Austro-Húngaro, de humildes padres de origen judío, vio morir a cinco hermanos pequeños durante su niñez. Todavía más dramático, cuando transcurrían sus 14 años enferma su hermano Ernst, apenas menor, de "hidrocardia", y muere luego de meses de invalidez, durante los cuales Gustav pasa largas horas a su lado narrándole historias. Aunque la muerte de Ernst parece haber sido capital en la vida de Mahler, esta dolorosa historia familiar no termina allí: uno de los hermanos, Alois, terminaría loco; otro hermano, Otto, se suicidaría a los 21 años.

Mahler eludió este mórbido destino familiar, en todo caso probable en la Bohemia del siglo XIX, con precoces cicatrices. Algunas de sus cartas de juventud muestran preocupación con la idea de la muerte a la vez que exaltados sentimientos de comunión con la naturaleza que denuncian una posición fuertemente romántica, que nunca lo abandonaría. En la dicotomía apolíneo-dionisíaca Mahler optaba, sin ningún género de vacilaciones, por Dionisios.

Sin embargo, los años de juventud y madurez de Mahler fueron de salud física y enormes progresos personales (la muerte y la locura no estaban, sin embargo, demasiado lejos, como en el caso de su amigo Hugo Wolff). Luego de deambular durante una década por distintos escenarios musicales de Europa Central, como un director en ascenso pero conflictivo, a los 38 años se lo encuentra Director de la Opera de Viena, uno de los cargos más importantes de la Europa musical. Era entonces famoso y respetado como director, sobre todo celebrado en sus versiones operísticas, a todos cuyos detalles atendía personalmente [1]. Como compositor había producido para entonces 3 sinfonías muy idiosincrásicas y por lo tanto controvertidas, y un número de bellísimos lieder.

Al cumplir los 41 años, Mahler, hasta entonces un soltero con un pasado de amores hiperbólicos y truncos y cierta fama de conducta irregular con las artistas a sus órdenes, conoce a Alma Schindler, hija de un conocido pintor, y un personaje por sí misma en la comunidad artística vienesa. Alma era 18 años menor que Mahler, hermosa según su propia opinión y la de sus contemporáneos, los cuales eran adeptos a amarla desde distintas distancias. Se casan en marzo de 1902 y en noviembre nace su primera hija, María. Alma ha de tener una enorme importancia en el juicio de la posteridad acerca de su marido, al que dejó retratado, no se sabe con qué fidelidad, en dos libros posteriores a su muerte, "Gustav Mahler" y unas memorias de su propia vida sumamente pintorescas y probablemente imaginativas.

Los primeros años de matrimonio fueron los más felices en la vida de Mahler. Pero con su ajuste a rígidos esquemas y horarios, fuertemente disciplinario y perfeccionista, y con una aplastante capacidad de trabajo, las cosas no fueron tan ideales para Alma, sujeta a estas imposiciones, ni tan apacibles para la Opera de Viena, donde se fue gestando un clima de oposición facilitado por el profundo antisemitismo de la época, que con una dudosa conversión de Mahler no logró atemperar. A su debido tiempo nace su segunda hija, Anna.

Mahler compone durante las vacaciones de verano en Maiiernig, en las que de manera interesante se muestra un activo deportista, dado a nadar en lagos helados y ascender colinas o emprender largas caminatas. Tan idílica situación se rompe con la ya referida muerte de María y el diagnóstico de su enfermedad cardíaca en 1907.

Curiosamente, la música compuesta por Mahler en este interregno de paz familiar y éxito profesional no armoniza con tales circunstancias exteriores. Progresivamente va siendo impregnada, penetrada por sentimientos desesperanzados, profundamente melancólicos o desesperados, y por la presencia, cada vez más fuerte y trágica, de la muerte misma. Su primera sinfonía, compuesta a los 27 años, tiene ya una marcha fúnebre, a la vez ominosa e irónica (estas marchas fúnebres, lúgubres pero más a menudo grotescas, alternando con marchas militares solemnes o dramáticas, son una constante en la música de Mahler). La segunda sinfonía, llamada

"Resurrección", juega con el tema de la muerte y transfiguración, por el momento con el triunfo de las fuerzas del espíritu y del amor universales, pero no sin un pasaje que, programáticamente, expresa el mismo Mahler de esta manera: "La tierra tiembla, las tumbas se abren, los muertos se levantan y se unen en una procesión sin fin". En 1904 completa su ciclo "Canciones para los niños muertos", sobre poemas de Rückert. El tema no es del agrado de Alma, quien cree, supersticiosamente, que no se debe llamar al destino, y esto le trae al compositor una reprimenda de su esposa. Ambos eran, probablemente, supersticiosos de maneras opuestas. Es probable que Mahler tuviera a Ernst en su mente al componer estas canciones.

La mayor disociación, que Egon Gartemberg [2] llama "casi esquizofrénica", ocurre con la sexta sinfonía, compuesta poco antes del nacimiento de Anna, en 1904, un año particularmente feliz en la vida de Mahler. Porque esta sinfonía, que el mismo compositor quiso llamar "trágica", es un documento terrible de inapelable desesperanza. En las frases de Bruno Walter, su discípulo, "la sexta es profundamente pesimista... Dice un rotundo 'no'. La existencia es una carga; la muerte es lo ansiado... *Non placet* es su veredicto sobre este mundo; en cuanto al otro, no se lo vislumbra en ningún momento". En el último movimiento, Mahler incluyó tres golpes de martillo, que, según expresara Alma, significan tres golpes del destino que habían de caer sobre el héroe. En sus recomendaciones para la partitura, Mahler indica que los golpes deben ser secos, como el golpe de un hacha al caer. (Más tarde, por temores no del todo claros, eliminó uno de estos golpes.) En el tercer movimiento, una poca rítmica "danza anticuada" le fue sugerida a Mahler por el zig-zag de unos niños jugando en la arena; y de la coda, él mismo dijo: "Aquí las ominosas voces de los niños se vuelven más y más trágicas, y hacia el final mueren en un sollozo".

Alma llama a la sexta una "composición profética". Tres años después, la predicción se cumple, y en rápida sucesión se dan los tres golpes del destino: el alejamiento de la Opera de Viena, la muerte de su hija y el diagnóstico de la enfermedad cardíaca.

La enfermedad diagnosticada por Blumenthal en 1907, ese momento crucial en la vida de Mahler, puede ser ahora visto con mayor profundidad. *A priori*, la angina de pecho no es fácilmente aceptable. Ningún dato del examen físico hubiera permitido a Blumenthal diagnosticarla, pero más importante, nada parece apoyar este diagnóstico en la vida anterior de Mahler: era, como se ha dicho, un activo deportista, y podía dirigir sin inconvenientes programas exigentes, al parecer con gestos y ademanes ampulosos, satirizados en las caricaturas de la época. Sus propias obras, a las que dirigía con frecuencia, son ciclópeas y necesitan un director en excelente estado físico. Lo que más naturalmente pudo haber encontrado el buen doctor Blumenthal en el episodio narrado anteriormente es un soplo cardíaco; y esto es precisamente lo que encontró. Este momento tan dramático es habitualmente tomado más o menos literalmente del relato que hace Alma [3]; no necesita, sin embargo, ser tomado al pie de la letra. Michael Kennedy [4], basado en la correspondencia del compositor, encuentra que Alma probablemente ha telescopado acontecimientos más alargados en el tiempo. En enero de 1907, seis meses antes de la muerte de María, Mahler escribe a Alma sobre su problema cardíaco, al que compara con el de su propia madre. Poco después, en marzo, otra carta hace referencias más precisas: "(el doctor Hamperl) encontró un leve defecto valvular, enteramente compensado, y le restó importancia. Me dice que puedo seguir con mi trabajo como antes y vivir una vida normal. Encuentro que no tengo temor a dirigir ahora". Así, es evidente que Mahler tenía un daño valvular que seguramente se manifestaba por un soplo y de cuyo origen no hay cuenta cierta, aunque algunos autores [5] hacen mención a una corea ocurrida en edad escolar, lo que sin duda sugiere fuertemente fiebre reumática.

Luego de la muerte de María, Blumenthal aconseja a Mahler que consulte a un especialista de Viena, el profesor Kovacs. Este es quien le dice, aparentemente, que

la condición es grave y que, de no cuidarse, puede resultar fatal. Kennedy opina que es improbable que el profesor Kovacs pronunciara la sentencia de muerte en términos concretos, pero Mahler puede haber sacado la inescapable conclusión de sus recomendaciones. Con absoluto olvido de las características de su paciente, Kovacs prohibió algunos de sus ejercicios más amados y restringió fuertemente su actividad, graduando cronométricamente sus paseos. Muy pronto Mahler, entre otras cosas de temperamento fuertemente obsesivo, comenzó a llevar consigo un podómetro.

El pronóstico asociado a su enfermedad cardíaca debe haber sido para Mahler sólo la confirmación de sus propias ansiedades premonitorias: un esperado, pero no por ello menos horrible, golpe de martillo. La anterior fascinación con una muerte posible se convertía ahora en la amenaza concreta de una inminente disolución. Las constancias del terrible infierno privado que vivió en sus últimos años surgen de sus conversaciones con Alma, su correspondencia y muy especialmente su música. No se precisa ser musicólogo sino un oyente atento y capaz de "sintonizar" con el lenguaje musical del compositor para penetrar ese infierno. Si cada hombre mantiene su propio diálogo con la muerte, el de Gustav Mahler ha quedado eternizado en su música. Dos de sus últimas composiciones, "La canción de la tierra" y la novena sinfonía son casi documentales para la cuestión. La primera es un ciclo sinfónico de canciones basado en meditativos y pesimistas poemas chinos. La canción final, "La despedida", pretendidamente sobre dos amigos que se reunen para despedirse, es, en la frase de Gartemberg, "el gesto de un hombre que ceremonialmente se dispone al digno ritual de la muerte". Cierto, hay también mucho del enorme amor a la vida que también formaba parte de la compleja naturaleza de Mahler, amor ahora agudizado por la certeza de la muerte, claramente visible en las palabras que él mismo agregara al poema:

La amada tierra por todas partes
florece en primavera y se vuelve verde
nuevamente!
Por todas partes y eternamente la distancia
brilla
eternamente... eternamente...

Este eternamente, repetido nueve veces, señala el fin de la obra, un final de una indescriptible, resignada tristeza v uno de los momentos supremos de la música romántica.

Se ha dicho que Mahler prefirió no numerar "La canción de la tierra" teniendo presente que un número singular de compositores había muerto luego de componer su novena sinfonía (Beethoven, Schubert, Bruckner, Dvorak). De este modo su propia novena sinfonía sería en realidad la décima y el destino quedaría burlado. Mahler murió después de completar la novena, dejando una décima incompleta, por lo que queda a gusto de la posteridad decidir quién burló a quién. Esta novena sinfonía, en el margen de cuya partitura escribió Mahler "¡Oh, días desaparecidos de juventud!", es por momentos grotesca, disociada, como un comentario cruel y sarcástico sobre la existencia. Sin embargo, más acorde con los predominantes sentimientos positivos de Mahler, aun en presencia de la muerte, el tono general es de nuevo de dolorosa despedida, a veces resignada, otras veces exaltada. El movimiento final, tiene audazmente un solo tema, llevado por meditativas cuerdas que van entrando despaciosamente, en un pianísimo progresivo que las hace extinguir en un murmullo final; así, las últimas notas escritas por Mahler parecen una respiración que va muriendo como en un suspiro suspendido. Antes de esta terrible pero serena extinción de la música, en el primer movimiento, la muerte se ha hecho presente para reclamar su presa: siguiendo sin intervalos a un momento de fantasiosa exaltación romántica hay una caída como en un abismo y, en las palabras de Alban Berg "la muerte se hace sentir con la mayor fuerza"; por momentos el oyente puede creer sentir su presencia física, helada y espectral.

Mahler no habría de oír ejecutadas ninguna de las dos composiciones. Obediente al veredicto médico, murió de una enfermedad cardíaca, tal como se le había pronosticado o él mismo había profetizado. Pero la naturaleza de su última enferme-

dad agrega a esta historia una intriga que, quizás, deba persistir sin aclaraciones definitivas.

Luego de su renuncia de la Opera de Viena, Mahler había aceptado un contrato para dirigir en el Metropolitan de Nueva York. Aunque su éxito fue inmediato, sus relaciones con el directorio y la orquesta se hicieron todo lo difíciles que su carácter autoritario y perfeccionista, sumado ahora a su tragedia personal, podían hacer suponer. Las relaciones con Alma eran también tensas. (La crisis de esta relación llevó a Mahler a una insólita consulta con el mismísimo Dr. Freud, quien suspendió unas vacaciones para entrevistarlo en un hotel en Leyden, durante 4 horas. Algunos hechos de esta entrevista se conocen por una carta de Freud, escrita al parecer, muchos años después de la misma. Freud diagnosticó, como es natural, una fijación materna y consideró, por lo tanto, que Mahler debería haberse casado con una mujer del mismo nombre de su madre, que se llamaba María, extrañándose que no hubiera sido así. Pero las leyes del psicoanálisis son estrictas, de modo que Mahler, en el mayor de los asombros por las capacidades proféticas del maestro, le informó que el segundo nombre de Alma era, en efecto, María. Lo vulgar de este nombre no empañó para nada la credibilidad de Mahler y Freud en las virtudes del psicoanálisis y ambos se separaron ampliamente satisfechos; el primero, curado según Ernst Jones [6] de sus dificultades matrimoniales, el segundo, meditando sin duda sobre sus virtudes terapéuticas. (Se trató, sin duda, del psicoanálisis más corto de la historia). En medio del permanente stress producido por sus dificultades y con programas musicales cada vez más exigentes, Mahler desarrolla en febrero de 1911 una "angina febril", pese a lo cual dirige un concierto, que habría de ser el último, al cual asiste Toscanini, entonces un joven director. La fiebre se prolonga de manera irregular. Por fin el médico de Mahler en Nueva York, Joseph Fränkfel sospecha el verdadero diagnóstico: endocarditis bacteriana. Los hemocultivos confirman el diagnóstico al mostrar los temidos estreptococos. La evolución fue la de una forma subaguda de la enfermedad, la que en aquella época, como se sabe, equivalía a una verdadera condena de muerte. De ahí en adelante Mahler ejecutó la historia natural de su proceso: meses de fiebre con mejorías parciales, deambulación por toda Europa buscando una cura inexistente mientras la enfermedad progresaba lentamente con aparición de complicaciones diversas. Al empeorar, Chvostek lo interna en un sanatorio en Viena. Allí, visitado por algunos amigos, muere el 18 de mayo de 1911, a los 51 años.

Había intentado sin éxito terminar la décima sinfonía, en cuyo manuscrito dejó sembrados mensajes desesperados dirigidos a Alma; en la última página que alcanzara a escribir, anotó al margen con letra clara: "Tú sólo sabes lo que significa. ¡Ah Adiós mi lira, adiós, adiós, adiós!". Fue enterrado en Grinzig, un suburbio de Viena, al lado de su hija.

Tal la historia de la enfermedad cardíaca, de Gustav Mahler. ¡Curiosa historia! Un pronóstivo que se cumple inexorablemente, pero merced a una complicación, la endocarditis, no predecible, ni obligada. ¿Casualidad? ¿Fantasías de la imaginación melodramática y supersticiosa de Alma, en cuya información se basan la mayoría de estos datos? Imposible precisarlo.

Los golpes de martillo, como la imagen de los niños jugando en la arena, sin embargo, quedan en nuestro espíritu como un documento de la extraña relación que Mahler parece haber mantenido con la muerte, una larga relación que sugiere un romance temido y buscado con una amante a la vez fascinante y repulsiva. Hay lugar para la duda. ¿Fue el estreptococo el asesino de Mahler, o el medio que éste eligió para encontrarse con la muerte?

Bibliografía

1. Gartember E: Mahler and his music, New York, 1978.
2. Mahler A: Gustav Mahler, traducción inglesa, tercera edición, Londres, 1973.
3. Kennedy M: Mahler, Londres, 1974.
4. Duce U: Gustav Mahler, Torino, 1973.
5. Jones E: Sigmund Freud, his life and work, Londres, 1955.

MEDICINA

FUNDADA EN 1939

PUBLICACION BIMESTRAL

(Registro de Propiedad Intelectual Nº 1.051.984)

MEDICINA no tiene propósitos comerciales. El objeto de su creación ha sido propender al adelanto de la medicina argentina. Los beneficios que pudieran obtenerse serán aplicados exclusivamente a este fin

Publicada con el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

EDITORIALES

Aceptaciones y rechazos

El procedimiento por el cual se acepta o rechaza la publicación de trabajos en las revistas médicas o científicas está, como todos los juicios humanos, sujeto a errores y es siempre criticable. El año pasado aparecieron, entre tantos, dos artículos perturbadores sobre este tema: Veamos el primero: *Would-Be Academician Pirates Papers*, publicado en *Science* 208: 1438, 1980. La historia es así: Elías A. K. Alsabti llegó a Estados Unidos en 1977 con una beca del gobierno de Jordania, trabajó en varias instituciones de importancia, "adquirió" un Ph.D. en inmunología del cáncer, fue admitido como miembro en 11 sociedades científicas y publicó más de 60 trabajos, la mayoría en 1979. Cuando se publica este comentario en *Science*, en junio del año pasado, a casi tres años de la llegada de Alsabti a Estados Unidos, todo este "imperio académico" —así lo llama el comentarista— comienza a derrumbarse. La mayor parte de los trabajos de Alsabti, si no todos, pertenecen a otros investigadores. Por ejemplo: tres artículos de revisión firmados por Alsabti resultaron ser copias textuales de una solicitud de subsidio de otro investigador con el cual estuvo en contacto. Otro artículo, publicado en una revista europea, resultó ser la copia de un trabajo publicado en Japón dos años antes por otros investigadores. Otro, que Alsabti publicó en Japón, es la copia de la tesis de un investigador de Kansas. A esto habría que agregar que Alsabti tenía, en 1980, 26 años, que decía ser pariente de la familia real de Jordania, que nadie vio su título de médico ni de Ph.D, que los coautores son ficticios, que las instituciones donde decía que se hicieron los trabajos son inexistentes, etc. Más detalles y los métodos seguidos por Alsabti para apropiarse de trabajos ajenos pueden leerse, con provecho, en la mencionada noticia. Vale la pena transcribir los comentarios de uno de los damnificados: "Tres cosas sobre Alsabti hay que tener presentes: es muy vivo, muy ambicioso y muy rico. No necesita el dinero. Cuando uno tiene esas tres cosas juntas todo lo que desea es ser famoso". Y este otro: "Alsabti conoce el sistema y conoce que nadie quiere ensuciarse. Nadie quiere ser el primero en decir: "¡Eh! ese tipo es un farsante". No puedo dejar de transcribir una de las hazañas de Alsabti: en uno de los trabajos puso como coautor al Director de los Servicios Médicos y Cirujano General de las Fuerzas Armadas de Jordania, quien, por supuesto, jamás trabajó con él. Pintorescos detalles de los siguientes pasos de su carrera pueden leerse en otros números de *Science* (209: 249, 1980, y 210: 291, 1980). En la última noticia,

hasta 1980, se sostiene que los artículos fehacientemente pirateados son ya siete.

El otro artículo perturbador es de D. P. Peters y S. J. Ceci (*The Sciences* 20: 16, 1980) y se llama *A Manuscript Masquerade*. Comienza citando una prueba hecha en 1977 por un periodista (C. Ross) con el libro *Steps*, de Jerzy Kosinski, ganador del *National Book Award* de 1969. El periodista mandó una copia mecanografiada de este libro, en la que sólo cambió el título y sustituyó el nombre de Kosinski por un seudónimo, a catorce casas editoras para que consideraran su publicación. Ninguno de los consultores reconoció el texto, todos lo rechazaron, aun la casa que lo había publicado. Los autores de este artículo, interesados en el proceso de revisión, aceptación y rechazo de los trabajos del campo que cultivan, la psicología, decidieron hacer un experimento en la línea del hecho con el libro de Kosinski. Seleccionaron 10 revistas de psicología en las que los revisores y redactores que ponderan los artículos enviados para su publicación conocen la identidad de los autores y su lugar de trabajo; tomaron un artículo de cada una, publicados de 18 a 32 meses antes del experimento, cambiaron el nombre de los autores, el título y el nombre de la institución donde trabajaron, preservaron intactos el diseño, los resultados y la discusión. Los artículos seleccionados procedían de los que se consideran los mejores departamentos de psicología de Estados Unidos y los autores eran también los mejores en su tema. Las revistas elegidas son de las que tienen un promedio de rechazos de artículos presentados del 80 %. Resultados: sólo el 10 % de los editores y revisores combinados y el 16 % de los revisores se dieron cuenta del engaño. En consecuencia, siete de los 10 seudomanuscritos siguieron el camino normal del proceso de revisión, con este resultado: sólo el 18 % de los redactores y revisores combinados recomendaron la publicación de esos artículos en sus revistas; los revisores fueron los más duros, sólo el 14 % de ellos recomendó la publicación. Las razones para rechazarlos: "no puede ser revisado, se necesitan más experimentos", "faltan controles", "defectos metodológicos", etc. Se hicieron también observaciones al estilo, organización, etc., algunas graves. Algunos redactores y revisores recomendaron que el trabajo se mandara a otras revistas por ser los temas adecuados o dentro de los tópicos cubiertos en esas otras revistas.

Hasta aquí los hechos, veamos las soluciones propuestas. Para el primer caso, las hazañas de Alsabti, uno de los saqueados sostiene que debían haberse verificado las credenciales de ese —hasta entonces— desconocido investigador, que se debían haber autenticado las comunicaciones personales y agradecimientos citados en los manuscritos, y que los mismos debían haber sido revisados por los autores de los artículos prominentemente citados en las referencias. El anónimo periodista de *Science* dice que algún redactor o revisor tendría que haberse dado cuenta de los sospechosos domicilios de Alsabti —varios y en distintos países— y de las curiosas instituciones donde decía haber realizado los trabajos, por ejemplo: *Albaath Specific Protein Reference Unit*, de Bagdad, Irak.

En el segundo caso, la mascarada de artículos ya publicados, los autores entienden que el defecto más ostensible del sistema de revisión es el prejuicio institucional; la institución donde se realizan los trabajos se considera más que los méritos de los mismos, proponen o sugieren experimentos adicionales para probar este punto. Mencionan varias soluciones posibles: un patrón de clasificación de los manuscritos con explícitos criterios de evaluación, la preparación de los revisores, la revisión del trabajo de los revisores, y lo más relacionado con los resultados de su experimento: la revisión a ciegas, desconociendo el nombre de los autores y el lugar de trabajo.

Es clara la contradicción entre los remedios propuestos; el remedio para

el primer caso es la causa de revisión injusta y falta de confiabilidad en la segunda situación.

Se puede elaborar largamente con estas dos situaciones, por ejemplo, con el enorme volumen de la producción científica y la imposibilidad de leer o siquiera mirar los títulos de los trabajos del campo que cada uno cultiva. Basta con decir que desde 1981 hay una revista, muy buena según los comentarios, que se llama *Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry*, sucesora del *Journal of Supramolecular Structure*, que se publica desde 1972, según la publicidad "será esencial para la creciente comunidad de científicos que trabajan en la interfase entre la biología molecular y la celular y cuyas necesidades no son servidas por ninguna otra revista". La misma casa editorial *(Alan R. Liss, Inc., N. Y.)* comenzó en 1980 la publicación de *Cell Motility* y *The Prostate*, y dejo de transcribir la publicidad que tengo a mano. ¿Quién puede leer tantas? ¿Quién puede pagar tantas suscripciones? ¿Cómo puede uno descubrir la publicación duplicada, triplicada o cuatriplicada? Uno no puede, entre todos sí.

No hay moralejas ni recomendaciones en este editorial. Los interesados pueden buscarlas, siempre hay algo escrito sobre casi todo, para qué repetirlo. También pueden reflexionar. Creo que estos dos casos si algo prueban es la fragilidad y la fortaleza de un sistema basado en la buena fe; el abuso de confianza es a veces la consecuencia. Pero el correctivo está incluido en el sistema, el conocimiento científico es público, comunicable, no privado ni inefable (Mario Bunge). En poco tiempo las mentiras grandes se destapan. Alsabti puede divertirnos pero no preocuparnos demasiado, es la excepción no la regla. Mucho más difícil es descubrir y corregir las pequeñas miserias de autores y revisores. Los autores debemos querer creer que la mentira no tiene pies, que tiene patas cortas (si las tiene), que presto es vencida y que al que miente le crece una jorobita. Los revisores y redactores debemos recordar una sentencia que Antonio Machado pone en boca de uno de los alumnos de Juan de Mairena: "Que no hay que confundir la crítica con las malas tripas".

J. A. BARCAT

El origen monoclonal de la placa aterosclerótica

La placa aterosclerótica está formada por un casquete fibroso que recubre una zona con restos celulares, fibras colágenas y lípidos, preferentemente colesterol. Es más fácil imaginarse la regresión del ateroma que la desaparición o retrogradación del componente de fibroblastos, de la proliferación de células musculares lisas y el colágeno depositado. En la aorta normal se comprueba que un 60 % del colágeno es del denominado tipo III (tres cadenas polipeptídicas alfa idénticas con algunas uniones disulfido y conteniendo cisteína) denominado también colágeno embrionario, pues se encuentra en la piel embrionaria, en el resto de tejido conjuntivo del embrión y en el sistema cardiovascular del adulto. El colágeno tipo I (dos fibras alfa idénticas y la tercera con una secuencia diferente de aminoácidos) es el que forma los tendones, la piel, la esclerótica, etc., y también parte del colágeno visceral del adulto. En la aorta con lesiones ateroscleróticas es mayor la participación del tipo I que en la aorta normal.

Respecto al origen de los fibroblastos que forman el casquete fibroso, Benditt y Benditt (1973) han propuesto que los mismos, provenientes de la proliferación de las fibras musculares lisas de la media, pertenecen todos a un

mismo clon, es decir que la placa fibrosa aterosclerótica es una especie de neoplasma benigno, sin alteraciones nucleares ni capacidad de dar metástasis, pero cuyas células se originan de la proliferación de una sola célula.

Benditt y colaboradores para sostener esta teoría se basan en la identidad de las isoenzimas de la glucosa -6- fosfato dehidrogenasa que se encuentran en las placas ateroscleróticas. Parten de la hipótesis (Mary Lyon) que las mujeres, que tienen naturalmente 2 cromosomas X, uno paterno y otro materno, en la embriogénesis inicial se anula al azar uno de ellos y las células que se originan de la división de dichas células mantienen las mismas características que las células de las cuales provienen. Siendo así que la variación de las isoenzimas se deben a los genes de los cromosomas X, las que tienen un cromosoma X de la madre tendrán isoenzimas diferentes a si lo tienen del padre. Como la anulación del cromosoma destinado a no funcionar se hace al azar, las mujeres son heterocigotas respecto a las enzimas de la glucosa -6- fosfato dehidrogenasa, teniendo dos isoenzimas de la misma. En las mujeres negras especialmente se encuentra que la isoenzima A es muy frecuente y cuantitativamente mensurable con métodos electroforéticos, lo mismo que la B que le sigue en frecuencia. En la aorta normal se encuentran ambas isoenzimas en proporciones semejantes, lo que demuestra que las células se originan al azar en distintas células madre y que no hay un proceso selectivo en la aorta normal. Por el contrario, en la placa de ateroesclerosis, se encuentra un solo tipo de isoenzima, lo que indica que las células que forman la placa se derivan de un solo clon. También podría postularse que se ha producido un proceso de selección por el cual las células que provienen de determinados clones tienen alguna ventaja que las hace suplantar a las células que provienen de otros clones y, por consiguiente, la placa no deriva de la proliferación de una célula sino que la población deriva de muchas células pero que, en el proceso de envejecimiento y desgaste, algunas de ellas tienen una ventaja selectiva sobre las otras y finalmente las suplantan.

Por otra parte, aunque raramente, se encuentran placas ateroscleróticas que tienen isoenzimas diferentes. Esto se puede producir porque la muestra procesada es demasiado grande e incluye a dos placas fusionadas en lugar de una. Otra posibilidad reside en que haya habido una trombosis en la región de la placa y, por tanto, al ocurrir la organización del trombo se encuentra un origen policlonal. Una tercera posibilidad radica en que en las placas hay también células inflamatorias, macrófagos, etc., los cuales son del tipo mixto y pueden explicar la presencia de isoenzimas diferentes.

Cuando se encuentra, pues, un solo clon hay que pensar en una mutación de las fibras musculares lisas o en una selección clonal producida luego de una repetida lesión de la íntima y su reparación. Sin embargo, Benditt, en un artículo de una monografía titulada *Atheroesclerosis is it reversible?* (1978), señala que en la aorta normal, aun en individuos de más de 90 años, se encuentran siempre dos poblaciones de células, lo que aparta de un proceso selectivo en las poblaciones monoclonales de las placas ateroescleróticas y apoya el origen mutacional. Hay que recordar que Virchow, ya en 1856, sugería que las placas son una consecuencia de la lesión de la íntima y que representan un proceso de cicatrización. La selección es lo que se observa en los estudios in vitro (cultivos de fibroblastos), en donde determinados clonos se adaptan mejor a las condiciones experimentales. In vivo, sin embargo, la existencia de una proliferación no es causal de selección pues, por ejemplo, la hiperplasia paratiroidea o los adenomas paratiroideos son uniformemente policlonales. Pearson, Dillman, Solez y Heptinstall (1981) estudian cicatrices cutáneas en mujeres heterocigotas para las isoenzimas A y B de la glucosa -6- fosfato dehidrogenasa. Si existiera la selección clonal, la misma debería encontrarse

en el centro de la cicatriz en donde hay mayor proliferación y debería ser mínima en los márgenes. Los resultados de estos autores demuestran que no hay diferencias, o éstas son muy pequeñas, y que la variación no es mayor de la que se encuentra en la piel normal.

Por analogía, el contraste que existe entre la aorta normal (policlonal) con respecto a la placa aterosclerótica (monoclonal) induce a atribuir la identidad de las isoenzimas a una mutación celular y no a una selección clonal. Los hallazgos de Thomas et al. (1973-76) en el cerdo hipercolesterolémico y aterosclerótico, en el cual encuentran características policlonales en las lesiones arteriales pueden interpretarse en forma semejante al hallazgo de Pearson y colaboradores en las cicatrices cutáneas. Es interesante notar que en las estrías grasosas *(fatty streaks)* humanas hay policlonía. Esto haría menos probable la hipótesis que las estrías grasosas sean precursoras de la placa ateroesclerótica (Pearson, Wang, Solez y H. Heptinstall, 1975).

En síntesis, parecería que en la placa ateroesclerótica el casquete fibroso proviene de la mutación de una célula de la capa muscular de la media que prolifera, cualesquiera sean las razones de esta proliferación, y no de una selección entre distintos clones.

A. Lanari

Importancia de las alteraciones citogenéticas en la transformación neoplásica en linfomas

Los caminos que conducen al desarrollo de una neoplasia y de los linfomas en particular son diversos. En todos los casos el mecanismo de origen del estado de malignidad presentaría una secuencia de pasos que se iniciarían con la aparición de células premalignas de larga vida, portadoras de una mutación, que permanecerían detenidas en su estadío de diferenciación y que mantendrían su capacidad de continuar la división (Klein, G., 1979). Las células mencionadas constituirían el sustrato para una subsecuente evolución citogenética, que concluiría con la aparición de una célula maligna con cambios cromosómicos característicos. La naturaleza de las anomalías cromosómicas, en el caso particular de los linfomas, dependería del tipo de célula afectada y del agente etiológico.

La teoría cromosómica de la carcinogénesis fue propuesta inicialmente por Boveri (1914) y reconsiderada muchos años después, siendo en este momento la base de los múltiples estudios realizados en este campo. Boveri demostró en sus experimentos, la individualidad y diversidad genética de los cromosomas, lo que eventualmente determinaría el desarrollo neoplásico. Asimismo, establece que el origen del cáncer tendría lugar en una única célula, con características propias para cada tumor y con determinada constitución cromosómica.

La detección de ciertos cambios cromosómicos de constancia relativa, específicamente traslocaciones, está íntimamente asociada con determinadas neoplasias. Estos hallazgos progresaron notablemente con la introducción de las recientes técnicas de bandeo cromosómico, que permiten la exacta diferenciación de cada par cromosómico así como el origen de los rearreglos. La aparición de estas anomalías específicas apoyaría la hipótesis del papel fundamental que tienen los cambios cromosómicos en la transformación de una célula normal en una maligna.

Las anomalías que involucran ganancias y pérdidas cromosómicas afectan el número de copias génicas y alteran la cantidad de productos de una célula

(Rowley, J., 1980); de este modo, si se modifica la regulación de la función génica, se modifica el balance entre genes para la expresión y supresión de malignidad.

En el estudio de los linfomas se encuentra que el principal hallazgo cariotípico lo constituye el marcador 14q +. La incidencia de esta anomalía cromosómica varía según el tipo de linfoma en estudio: se la observa en forma prácticamente constante en el linfoma de Burkitt y es relativamente rara su aparición en la enfermedad de Hodgkin. Manolov-Manolova (1972) detectaron por primera vez el 14q + en el linfoma de Burkitt y determinaron posteriormente el origen de este marcador a partir de una traslocación recíproca entre los cromosomas 8 y 14 (Zech, 1976) con puntos de ruptura aparentemente idénticos en diferentes casos. Se sabe que la t(8q −; 14q +), asociada al linfoma de Burkitt, no se observa solamente en la variedad africana, portadora del virus Epstein Barr (VEB), sino también en la americana y en la leucemia linfoblástica aguda a células B, tipo Burkitt. Por otra parte, no se ha detectado aún en líneas célulares linfoblastoides transformadas por VEB, lo que indicaría que este virus no es el responsable de la traslocación.

Lo antes dicho nos permite suponer que existiría un agente que actúa sobre los linfocitos B produciendo la aparición de células preneoplásicas de larga vida, que se dividirían repetidamente permitiendo una diversificación citogenética. La aparición posterior de la t(8; 14), en algún momento de la evolución de dichas células, llevaría a la aparición de un tumor monoclonal autónomo. En el caso particular de la variedad africana del linfoma de Burkitt, el VEB podría ser un elemento de inmortalización de las células B, colaborando en este mecanismo las alteraciones inmunológicas consecuentes a la malaria holoendémica crónica de la región (Klein, 1979). La aparición de esta traslocación en linfomas negativos para VEB implicaría que se puede llegar a una misma situación citogenética final, a partir de un comienzo algo diferente, debido quizá a agentes carcinogénicos diversos o a mutaciones espontáneas.

Este marcador 14q + aparece en un porcentaje significativo en otros tipos de linfomas. La constante aparición y especificidad de rearreglos del cromosoma 14 en los desórdenes linfoproliferativos ha permitido compararla con la especificidad de la t(9; 22) en la leucemia mieloide crónica (LMC). Actualmente se considera que la presencia del marcador 14q + confiere ventajas proliferativas a las células linfoides (McCaw, 1975), ventajas que podrían deberse a la aparición de un efecto de posición que dependería de la interacción de un gen o genes con respecto a los genes que lo rodean. Más específicamente, Mark (1978) sostiene que el segmento distal del brazo largo del cromosoma 14 contiene genes que influencian o determinan el desarrollo de células provenientes del tejido linfoide. Es posible que estos rearreglos puedan ser relacionados con una interrupción del camino normal de la diferenciación de linfocitos, resultando en una proliferación anormal y enfermedad. Esta hipótesis se ve confirmada por la presencia de un punto de mayor labilidad en la región distal del brazo largo del cromosoma 14: 14q32, a nivel de la cual dicho cromosoma actuaría como receptor, aceptando material ya sea desde su homólogo o de otros cromosomas como es el caso del 8 en linfoma de Burkitt (LB), 11 en linfosarcoma o bien de los pares 1, 4, 10, 15 o 18 en linfomas no-Burkitt. Además de las anomalías cromosómicas específicas de determinados tejidos neoplásicos, como lo es el 14q + para el tejido linfoide, se encuentran otras características distintas, que pueden ser observadas en otro tipo de tumores. Un ejemplo claro de esta situación es el dado por las alteraciones que involucran al cromosoma 1. La duplicación de parte del brazo largo, específicamente entre las regiones 1q25 y 1q32, sería responsable de un aumento potencial de malignidad celular. Esta situación estaría relacionada con la aparición de cam-

bios a nivel de genes que codifican para enzimas que regulan el metabolismo de los ácidos nucleicos, constituyendo la base de las ventajas proliferativas de las células mutantes, eventualmente formadoras de clones de alta malignidad (Rowley, 1978).

Se han descripto hasta el presente diversas anomalías cromosómicas en los diferentes tipos de linfomas no-Hodgkin y no-Burkitt. Los hallazgos más frecuentes corresponden, aparte del 14q + a los marcadores 6q–; 1p–; 11q–; 1q–; 9q–; 18q–; 3p– y 8q–, las trisomías 3, 7 y 18 y las monosomías 8 y 15 (Mark, 1979). Una estimación de la frecuencia de aparición de estas anomalías indica que un 45 % de los linfomas presenta el marcador 14q +, en tanto que los marcadores 6q–, 1p–, 10q–, 11q– y 13q–, son observados entre el 15 % y el 25 % de los casos (Mark, 1979). Esto y la observación de otras anomalías de menor frecuencia de aparición conforman la presencia constante en esta patología de cambios cromosómicos no al azar.

En lo que se refiere a la enfermedad de Hodgkin, la aparición de aberraciones cromosómicas es un claro índice de que se trata de una neoplasia y no de una enfermedad inflamatoria (Sandberg, 1980). Resulta frecuente el hallazgo de un 50 % de cariotipos triploides, encontrándose también una elevada proporción de pacientes con un número modal diploide o tetraploide y la presencia significativa de variabilidad cariotípica. Es frecuente hallar en esta patología la presencia de rearreglos estructurales de los cromosomas 3, 5, 6, 11 y 12 (Hossfeld, 1977). Consideramos relevante citar la presencia constante de anomalías cromosómicas en las linfoadenopatías angioinmunoblásticas, hallazgos éstos que indican que se trataría de un estadío prelinfomatoso, y aun quizá de un linfoma (Sandberg, 1980).

En cuanto a la experiencia adquirida en nuestro laboratorio de Cultivo de Tejidos y Citogenética del Instituto de Investigaciones Hematológicas, los hallazgos corroboran lo anteriormente expuesto (Tabla 1). Al estudiar la correla-

TABLA 1. — *Anomalías cromosómicas observadas en linfomas no-Hodgkin*

LLBD - N	LLPD - N	LLPD - D
1p+	1p+	1p+
14q+	t(1 ; 2)	1q+
	t(1 ; 10)	+1
	t(1 ; 18)	+3
	2p—	6q—
	+5	+7
	14q+	13q+
	18q+	14q+
		r/2r

LLBD-N: Linfoma linfocítico bien diferenciado nodular; LLPD-N: Linfoma linfocítico poco diferenciado nodular; LLPD-D: Linfoma linfocítico poco diferenciado difuso.

ción entre el estadío clínico y el tipo de anomalías encontradas, se observan alteraciones de mayor malignidad cuanto más avanzado es el estadío clínico. Es así que todos los casos estudiados en estadío IV (con diferentes diagnósticos histopatológicos) con mala evolución clínica y escasa respuesta al tratamiento, presentaron indefectiblemente duplicación de parte del brazo largo del cromosoma 1, índice, como se señaló anteriormente, de malignidad celular (p. 297 de este número).

Los datos bibliográficos y nuestra experiencia permiten formular las siguientes conclusiones sobre el estado actual de la citogenética en linfomas:

1. La especificidad del marcador 14q + en tejido linfoide con el hallazgo característico de la t(8q–; 14q +) en linfoma de Burkitt y de la t(11q–; 14q +) en linfosarcoma.

2. La posibilidad de caracterizar a los linfomas de acuerdo con la naturaleza de la traslocación 14q + o de los diferentes marcadores detectados.

3. El establecimiento de una correlación entre los hallazgos citogenéticos y el estadío clínico de cada caso.

4. El aporte a la clarificación de la clasificación histopatológica y la respuesta al tratamiento.

Existe por delante un largo camino por recorrer y no hay duda que la profundización de los estudios citogenéticos constituirían una de las claves para dilucidar la etiopatogenia de las neoplasias linfoides.

IRMA ROSA SLAVUTSKY

Estudios citogenéticos en enfermedades hematológicas

Desde la introducción de los estudios citogenéticos hace más de 20 años, el progreso en las técnicas de estudios cromosómicos con la incorporación del "bandeo", que permite mediante coloraciones especiales (giemsa, quinacrina) diferenciar bandas en los brazos cortos y largos de los cromosomas, ha posibilitado reconocer e individualizar, además de las alteraciones numéricas, alteraciones estructurales y caracterizar anomalías asociadas a diferentes enfermedades, entre ellas las neoplasias. Las enfermedades hematológicas, al permitir un estudio directo de las células anormales circulantes en la sangre o que infiltran la médula ósea o los ganglios linfáticos, han tenido un importante avance en este aspecto, tal como se señalan en los artículos de las páginas 293, 297 y 382. De los artículos de revisiones publicados hasta el momento, podemos resumir lo siguiente:

1. *Síndromes mielodisplásicos (SMD).* En esta entidad se agrupan actualmente las anemias refractarias con exceso de blastos, anemias sideroblásticas idiopáticas, "preleucemias" en general, etc., procesos con diferentes mecanismos fisiopatogénicos y, por lo tanto, difícil de definir conceptualmente, que se caracterizan por presentarse en pacientes de edad avanzada, habitualmente con citopenias periférica y con médula ósea hipercelular y con cambios cualitativos en sus elementos. En ellos se han encontrado diversas alteraciones en el cariotipo de las células mieloides, en un 30-50 % de los pacientes, tanto numéricas (+8, –8, –5, –7, –Y, etc.) como estructurales (7q–; 20q–). Un síndrome especial de anemia refractaria se ha identificado con la deleción 5q–, que si bien responde poco a diversos tratamientos, su evolución a leucemia mieloide aguda es infrecuente. Igual deleción (5q –) se ha encontrado también en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y en un caso de leucemia linfoblástica aguda (LLA) a linfocitos T. En algunos casos de SMD las alteraciones del cariotipo se han encontrado también presentes en linfocitos periféricos estimulados con fitohemaglutinina, lo que apoyaría que un cierto porcentaje de linfocitos circulantes derivan de la misma célula troncular alterada o bien que ellas sean células tronculares circulantes. La evolución a LMA de los pacientes con SMD puede ocurrir en un 20-40 % de los casos, lo que parece ser más frecuente en aquellos con alteraciones cromosómicas múltiples. En un 80 % de los pacientes con transformación leucémica, además de las anomalías del período preleucé-

mico aparecen otras alteraciones cromosómicas, pero sin una característica determinada. Sokal, G. et al, *Blood*, 46: 519, 1975; Sokal, G. et al, *Clinics Haemat* 9: 129, 1980; Sandberg, A., *Educat Program* 32, Congr Int Hemat, Montreal, 1980; Abe, S. et al, *Am J Hemat* 6: 259, 1979; Geraedts, J. P. et al, *Acta Med Scand* 207: 447, 1980).

2. *Leucemias mieloides agudas* (mieloblástica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia, etc.). Previo al tratamiento, un 50-60 % de estos pacientes presentan alteraciones cromosómicas numéricas (hipo o hiperdiploidía) y/o estructurales, especialmente relacionadas a los cromosomas 5, 7, 8 y 21, pero otros cromosomas también pueden estar comprometidos (1, 15, 17, 20, etc.). Entre las alteraciones estructurales, las translocaciones: t(8q–; 21q+) y t(15q+; 17q–) han sido las más frecuentes. La t(8; 21) se encontró asociada a leucemias promielocíticas, con cuerpos de Auer, baja actividad de fosfatasa alcalina y buena respuesta terapéutica. Es de interés, que pacientes con LMA y con antecedentes de exposición a agentes carcinogénicos (solventes, insecticidas, etc.) tienen una mayor incidencia de alteraciones cromosómicas; lo mismo ocurre en las leucemias "secundarias" o adquiridas, que aparecen en el transcurso de otra hemopatía (policitemia vera, mielofibrosis, etc.) o post-tratamiento de linfomas o mielomas, especialmente alteraciones en los cromosomas 2, 5 y 17; estas leucemias se caracterizan por su pobre respuesta terapéutica y peor evolución que las leucemias *de novo*. Mal pronóstico evolutivo también se ha señalado en aquellos pacientes que solamente presentan población celular con cariotipos anormales. (Sandberg, A.; Garson, O. M., *Clinics Haemat* 9: 39, 1980; Mitelman, F., *Clinics Haemat* 9: 195, 1980).

3. *Leucemia linfoblástica aguda (LLA).* En un 50-70 % de los pacientes se puede observar, previo al tratamiento o durante la evolución, alteraciones cromosómicas. Anomalías en el número se han encontrado en varios cromosomas, especialmente en el 6 y 21; entre las alteraciones estructurales (deleción, adición o translocación), los cromosomas 1, 3, 6, 7, 14, etc., han sido los más frecuentemente comprometidos. La anomalía 14q+, como se enfatiza en otro editorial, ha sido considerada como un marcador importante de procesos linfoproliferativos de linfocitos B y también se lo ha encontrado en algunos casos de LLA. Las otras alteraciones señaladas son comunes a las diferentes subpoblaciones linfocitarias, si bien en casos de LLA a linfocitos T las anomalías de los cromosomas 3, 14 y 15 son más frecuentes. Las alteraciones del cariotipo en las LLA no parecen tener la importancia pronóstica que se ha referido para las LMA. (Sandberg, A; Whang Peng, J. et al, *Clinics Haemat* 9: 87, 1980).

4. *Leucemias agudas con cromosoma Ph_1 positivo.* Se han comunicado un número creciente de pacientes con diagnóstico de LMA o LLA que tienen cromosoma Ph^1 positivo. A diferencia de la leucemia mieloide crónica (LMC), en estos casos la t(9q+; 22q–) es menos frecuente, siendo más constante la deleción del brazo largo del cromosoma 22 (22q–) con pérdida del fragmento o translocándose en otros cromosomas (3, 11, 13, 19, 21). Igualmente, la existencia de hipodiploidía u otras alteraciones cromosómicas, la presencia simultánea de clones celulares Ph^1 positivos y negativos, etc., se han señalado que distinguirían estas leucemias agudas de la LMC o de su crisis blástica. El cromosoma Ph^1 habitualmente desaparece en la remisión de las leucemias agudas. La LLA con cromosoma Ph^1 + tiene una evolución desfavorable respecto a las formas habituales Ph^1 negativas, diferencia pronóstica no evidente en los casos de LMA. La observación que estas leucemias agudas, luego de un período de remisión, pueden transformarse en una LMC y que luego de una evolución corta o prolongada en una "fase crónica" terminan en una "crisis blástica" mie-

loide o linfoide, ha llevado a que se postule que el cromosoma Ph[1] es un marcador de célula troncular primitiva, común a las progenies mieloide y linfoide. Su transformación clonal podría dar diferentes expresiones celulares en determinados momentos de la evolución y, por ello, tener diversas formas clínicas, afirmándose que las leucemias Ph[1] positivas podrían constituir un tipo especial de síndrome mieloproliferativo. (Sandberg, A.; Catovsky, D., *Brit J Haemat* 42: 493, 1980; Rowley, J. D., *Clinics Haemat* 9: 55, 1980).

5. *Leucemia mieloide crónica (LMC).* Como se demuestra en el artículo de la página 293, la existencia del cromosoma Ph[1], t(9q+; 22q−), ha sido considerado como un marcador importante de la LMC, hallándosele en un 85 % de los pacientes con esta patología, pero además sirve para distinguir una forma evolutiva más favorable. La LMC con cromosoma Ph[1] negativo ocurre en un 15 % de los casos y se caracteriza por tener mieloesclerosis, diferencias en algunos parámetros hematológicos y una sobrevida corta, con alta incidencia de muerte por causas hematológicas, lo que demuestra el valor pronóstico de este marcador cromosómico. En el 90 % de los casos el cromosoma Ph_1 se forma por la deleción de un fragmento del brazo q del cromosoma 22 (en la banda 11) y su translocación al brazo q del cromosoma 9 (en la banda 34). En el 10 % restante, la translocación es a otros cromosomas diferentes del 9 (2, 3, 10, 12, 17 etc.), lo que no varía su importancia pronóstica. Deleción del cromosoma 22, similar al Ph[1], también ha sido hallado en meningiomas, carcinoma de pulmón y linfoma maligno, no conociéndose su significación clínica.

En el 10-30 % de las LMC se encuentran otras alteraciones numéricas y/o estructurales (+8, −ZY, doble Ph[1], i(17q), etc.). La ausencia del cromosoma Y ha sido postulado que se correlaciona con un mejor pronóstico evolutivo. La aparición de anomalías cromosómicas durante la evolución de la LMC, tales como hipo o hiperdiploidía (+8, +17, +19) o reacondicionamientos estructurales en varios cromosomas (1, 8, 19, i(17q), doble Ph[1], etc.), como alteraciones únicas o asociadas, han sido comunicados por diversos autores como característicos y/o predictivos de una "metamorfosis o agudización" de la LMC, como también se demuestra en la página 293 de este número. Se ha referido que las alteraciones del cromosoma 1 podrían estar influenciadas por la medicación previa del paciente, pues se ha encontrado en casos que recibieron citocina arabinósido, daunoblastina y thioguanina, pero no en los tratados con busulfán. La evolución clonal y alteraciones cromosómicas de las "crisis blásticas" se ha visto que puede iniciarse tanto en células de la médula ósea como en células localizadas en el bazo. (Sandberg, A.; Rowley, J. D.; Mitelman, F.).

6. *Otros síndromes mieloproliferativos* (policitemia vera, mielofibrosis, trombocitemia). En la policitemia vera (PV), previo al tratamiento, un 13-26 % de los casos pueden presentar alteraciones numéricas en los cromosomas 1, 8, 9, 20 e Y, modificaciones que no se correlacionan con una evolución clínica determinada. Durante la evolución de la enfermedad, especialmente pacientes tratados con fósforo radioactivo o quimioterapia, aumenta el porcentaje de hallazgos de anomalías cromosómicas habiéndose encontrado con frecuencia deleción del cromosoma 20, t(20q−; 11q+), similar a lo descripto en SMD, siendo en estos casos mayor la incidencia de muerte por causas hematológicas, en particular su transformación a leucemia aguda. Existen dos casos de PV que adquirieron en su evolución el marcador Ph[1], uno de ellos en su transformación leucémica. En los restantes SMP (mielofibrosis, trombocitemia), también se han encontrado, aunque con menor frecuencia, alteraciones numéricas y/o estructurales en los cromosomas 5 7, 8, 20, 21 e Y, siendo su significado clínico poco claro, si bien se presentan en mayor proporción cuando tienen una evolución a

leucemias agudas. (Sandberg, A.; Mitelman, F.; Lawler, S. D., *Clinics Haemat* 9: 159, 1980).

7. *Leucemia linfática crónica* (LLC). La dificultad en estudiar el cariotipo de los linfocitos B de esta enfermedad, por su bajo índice mitótico espontáneo y los escasos mitógenos específicos para estos linfocitos con que se cuenta hasta ahora, hacen que sean reducidos los estudios citogenéticos comunicados en esta patología. En ellos se han descripto algunas alteraciones cromosómicas numéricas (+ 9, + 21, + 17, etc.) y otras estructurales, especialmente translocaciones en los cromosomas 1, 7, 8, 9, 10, etc., y, en algunos casos aislados, la translocación 14q +, hallazgos que no han podido ser correlacionados con determinado cuadro clínico o pronóstico. (Mitelman, F.; Whang Peng, J. et al).

8. *Enfermedad de Hodgkin y linfomas no-Hodgkin.* En la excelente revisión de otro Editorial se detallan exhaustivamente las diversas alteraciones cromosómicas halladas en estas patologías, enfatizándose el valor del marcador 14q + en el linfoma de Burkitt y de otros linfomas y las probables implicancias de las alteraciones citogenéticas en el desarrollo de los linfomas. Es conocida la falta de uniformidad y la dificultad que existe en la clasificación histológica de los linfomas no-Hodgkin y su correlación con la evolución clínica y respuesta terapéutica. La división en histología "favorable, medianamente favorable y desfavorable" es un intento que parece tener cierta correlación clínica, que permite hacer un pronóstico evolutivo y un enfoque terapéutico de diferente agresividad. Sin embargo, existen casos en que la evolución clínica escapa a esta regla y tal vez la correlación de los estudios histológicos, de marcadores celulares citoquímicos e inmunológicos y de estudios citogenéticos, puedan en el futuro establecer una mejor clasificación fisiopatológica y aportar datos de mayor valor que los existentes hasta ahora, respecto a la agresividad potencial de los tumores linfoides y al pronóstico evolutivo. No obstante, hasta el momento, no existe información casuística suficientemente numerosa para afirmar que las alteraciones cromosómicas tengan un valor definitivo en este aspecto. Respecto al marcador 14q + en estos linfomas, t(8q –; 14q +), hay quienes afirman que probablemente la deleción del brazo largo del cromosoma 8 sea el hecho más importante, teniendo a veces como receptores a otros cromosomas diferentes del 14. En ciertos linfomas de linfocitos tipo T (síndrome de Sézary, micosis fungoide, etc.), se han señalado varias alteraciones cromosómicas, en el 1, 2, 8, 11, 14, 21, etc., pero especialmente translocaciones que comprometen el 1, 6, 8 y 14. (Sandberg, A.; Mitelman, F.; Atkin, N. B., *Clinics Haemat* 9: 175, 1980).

9. *Mieloma múltiple y macroglobulinemia.* Alteración numérica del cromosoma 8 y estructurales del 1, 6, 11 y 14, especialmente 14q +, ha sido hallado en el mieloma, fundamentalmente en la "fase de aceleración" de la enfermedad. En la macroglobulinemia, poliploidia y deleción del brazo corto del cromosoma 3 (3p –), han sido las alteraciones más frecuentes. (Atkin, N. B.).

De lo expuesto anteriormente se puede concluir que en las enfermedades hematológicas, lo mismo que en otros tumores, se han descripto alteraciones que comprometen a la mayoría de los cromosomas, pero que con mayor frecuencia afectan a un grupo determinado de ellos (1, 8 y 14) y relacionados a ciertas regiones o áreas cromosómicas. Estos cromosomas o áreas cromosómicas podrían, en ciertos casos, dirigir o influenciar la proliferación o diferenciación celular y sus alteraciones ser causa de la iniciación del crecimiento de un clon celular tumoral o facilitar su desarrollo. La posible acción de

agentes mutagénicos u oncogénicos en estas alteraciones es sugerido por la alta incidencia de ellas, en pacientes con LMA expuestos a dichos agentes o en pacientes con radio y/o quimioterapia que desarrollan leucemia aguda secundaria. Otro punto de interés es la diferente incidencia de determinadas alteraciones cromosómicas en una misma enfermedad, según cuál sea el área geográfica considerada, lo que podría correlacionarse a la diferencia en los agentes potencialmente mutagénicos de cada región. Sin embargo, es prematuro asegurar que las alteraciones cromosómicas por sí solas tienen una estricta correlación y un valor definido en la fisiopatogenia, evolución clínica y respuesta terapéutica en las enfermedades hematológicas. Su hallazgo, si bien ocurre en algunas patologías con frecuencia tal que pueden ser consideradas como marcadores de una determinada entidad o variedad clínica, otros pacientes con igual diagnóstico y cuadro clínico pueden no presentarlos. En otros casos, las alteraciones cromosómicas se hallan sólo en un porcentaje no significativo de pacientes y sin correlación con parámetros clínicos y/o evolutivos.

No obstante, es evidente que en las enfermedades hematológicas mielo y linfoproliferativas el solo estudio de la morfología celular o histología es ya insuficiente. El estudio citogenético, junto a otras técnicas como los marcadores celulares citoquímicos e inmunológicos, el cultivo in vitro de médula ósea, el estudio genético del sistema HL-A, etc., y su correlación clínica, es el camino inmediato más promisorio para la mejor identificación, interpretación fisiopatogénica, pronóstico evolutivo y más racional terapéutica de estas patologías.

J. C. Sánchez Avalos

— — — —

Como cada hombre, cada pueblo tiene su representación propia (del mundo), y en la ciencia se distingue por su preferencia a tal rama o tal método, pero no puede en rigor decirse que haya ciencia nacional alguna. Todo lo que se repita y vuelva a repetir el trivialísimo lugar común de que la ciencia no tiene nacionalidad, todo será poco, porque siempre se lo olvidará de puro sabido, y siempre "se hará ciencia" para cohonestar actos de salvajismo e injusticia.

Miguel de Unamuno (1864-1936)

En torno al casticismo, 1916

Profesor Raúl F. Vaccarezza

En el último número de *Medicina* (41: 271, 1981) se comentó el libro del Profesor Raúl F. Vaccarezza, "Vida de médicos ilustres". El Dr. Amadeo P. Barousse, quien escribió la bibliografía mencionada, repetía lo que había dicho sobre un libro anterior del mismo autor, también comentado en *Medicina*: "No es la importancia de la obra el principal estímulo para el comentario sino la importancia del autor". Y don Raúl F. Vaccarezza cumplió infatigablemente hasta su muerte, a los 87 años, con ese imperativo de trabajar, investigar, escribir y enseñar, pues el libro mencionado no es su obra póstuma.

Hace más de 50 años que conocí a Vaccarezza. Fue Secretario de la Facultad de Medicina en los dos decanatos de mi padre, en 1918 y en 1926. En ese período de renovación universitaria —la "Reforma" no fue, al menos en sus primeros años, exclusivamente un movimiento político, sino que con ella se renovaron y crearon muchos de los mecanismos que hicieron progresar a la Universidad Argentina— Raúl Vaccarezza estuvo presente en todos los acontecimientos universitarios, científicos y políticos con una línea de conducta invariable, con un respeto inconmovible por las leyes y reglamentos, con un criterio ético intransigente aun en cuestiones menores. Vaccarezza, como bien lo dijo Horacio, *Leges sine moribus vanae*, fue intransigente en su conducta pues sabía que si no hay fundamentos morales las leyes se derrumban, y porque hay muchas cosas y actos que son permitidos por las leyes pero que la moral individual no puede aceptar. Las sociedades decaen y se degradan cuando sólo queda el cartabón de la legalidad.

No voy a detallar todo lo que realizó Vaccarezza. Fue un paladín de la docencia libre. Sus cursos completos reunían a gran cantidad de alumnos, lo que habla bien de ellos, pues Vaccarezza era severo en la enseñanza y en su valoración. Cuando se hizo cargo de la Dirección de la Cátedra de Patología y Clínica de la Tuberculosis, después de un conflicto de intereses espúreos en que tuvo finalmente que dictaminar el Procurador General de la Nación, Vaccarezza se dedicó a ella por entero. Organizó la enseñanza con ateneos y reuniones anatomoclínicas, en las que Oscar Croxatto nos enseñó realmente lo que significaba el estudio de la Patología tanto en el siglo pasado como en el presente. Creó un laboratorio experimental, cuyo primer jefe fue el bacteriólogo Andrés Arenas, donde se podía experimentar con animales grandes y pequeños. La sección Fisiopatología Respiratoria tuvo el equipo y el personal adecuado para realizar una tarea que fue pionera en el país. Así colaboraron las distintas secciones para que entre los años 1940 y 1960, la Cátedra de Patología y Clínica de la Tuberculosis fuera el centro que atrajo a más gente joven con deseos de hacer investigación clínica. Becarios sudamericanos y médicos del interior del país encontraron un ambiente adecuado y comodidades en el pabellón destinado a ellos. Además, para unos pocos clínicos investigadores se crearon puestos con 35 horas semanales.

Vaccarezza trabajó duramente. En ningún lado, y mucho menos en nuestro país, se consigue armar un mecanismo tan vasto y complejo sin una labor titánica de muchas horas. Alguna vez le pregunté a Vaccarezza por qué no se dedicaba *full-time* a la Cátedra. Me contestó que nunca sería *full-time* pues ello le privaría de las más grandes satisfacciones personales que puede tener un médico y que es sentirse útil para sus enfermos y gozar del agradecimiento y amistad de los mismos. El *full-time* permitiría mejores posibilidades para la investigación, pero no compensa esta pérdida afectiva personal.

Vaccarezza tenía un aspecto serio y distante. No invitaba a que uno se sintiera "en confianza" con él. No tuteaba a nadie, salvo a sus compañeros de la infancia. Todo parecía planeado previamente y realizado con método. Sus clases eran modelo de orden y de organización pero por esto mismo aburridas. Si se las registraba en un grabador no había necesidad de corregirlas. Sin embargo, esta virtud de no olvidarse de nada y de describir las radiografías con detalle y perfección distraía a los oyentes, pues sabían de antemano cómo terminaría la frase. Y en esto Vaccarezza nunca cambió. Amaba el conocimiento racional y detestaba la improvisación. Si se sigue un método no se producen olvidos, que son la causa más frecuente de los errores diagnósticos de los buenos médicos. A menudo Vaccarezza encontraba imágenes patológicas que no habían sido descubiertas por otros, pues él examinaba los arcos costales, los demás huesos del tórax y las partes blandas con la misma atención con que observaba las playas pulmonares. Una vez, en un *situs inversus*, Vaccarezza, que no conocía al enfermo, colocó las radiografías con el corazón a la derecha, pues la identificación de la placa demostraba que ésa era la verdadera posición, a pesar de las protestas de los presentes, a quienes nos llamaba la atención que pusiera las placas al revés. Vaccarezza se equivocaba muy raramente. En esta forma indirecta nos demostraba que en la medicina asistencial se necesita una semiología completa, lo que no significa detallista, y pensar con lógica. Con estos dos ingredientes más amor por el enfermo se forma el buen médico.

Lo conocí a Vaccarezza como amigo de mi padre y de mi familia, lo conocí siendo yo estudiante de Medicina, luego como médico de su servicio y jefe de fisiopatología de la Cátedra de Tisiología. Más tarde, ambos fuimos profesores titulares de la Facultad. Cuando ingresé como miembro de la Academia de Medicina, Vaccarezza era su presidente. Fui su médico en su última enfermedad y siempre fui su discípulo. Cuando joven, lo respetaba por su integridad y admiraba sus conocimientos. Sentí que Raúl Vaccarezza era el ejemplo que debía guiar mi conducta como clínico y como persona. Eramos temperalmente muy diferentes. ¿Pero qué impor-

ta si coincidíamos en la apreciación de los mismos valores? Los muchos años nivelaron las diferencias de edad y seguí siendo su discípulo pero me convertí también en su amigo. Teníamos tantos recuerdos comunes en este largo lapso de cincuenta años. Creo que es una catástrofe para un hombre el no tener agradecimiento para nadie, pues revela un desierto espiritual y sentimental. Por el contrario, uno enriquece su vida cuando reconoce los valores de otros que lo ayudaron y moldearon su personalidad. Raúl F. Vaccarezza moldeó la mía junto con Bernardo Houssay y Eduardo Braun Menéndez.

A. Lanari

Infección congénita y perinatal con virus Junin en cobayos

Hasta el momento no hay datos publicados referidos a la morbimortalidad que produce la infección con virus Junin en mujeres embarazadas y del efecto que el pasaje transplacentario de esta infección podría tener sobre el feto y el recién nacido. Maiztegui y col. comunicaron la transmisión de la infección al recién nacido comprobando la eliminación del virus Junin a través de la leche en uno de dos casos estudiados [4].

En sentido amplio las infecciones congénitas pueden producir efectos diferentes, tales como: malformaciones, infecciones latentes con inducción posterior de enfermedad, función anormal con o sin daño histológico, enfermedad aguda con muerte fetal y eventualmente abortos [1]. Trabajos científicos previos muestran la capacidad de ciertos virus en la producción de las alteraciones congénitas antes mencionadas, la mayoría de las cuales ocurren como consecuencia del pasaje del virus a través de la placenta, luego de una importante diseminación hematógena del mismo. Entre los virus recuperados de tejido placentario podemos mencionar a aquellos que producen las siguientes enfermedades: rubeola, herpes simple, poliomielitis, enfermedad citomegálica, varicela-zoster, viruela y encefalitis japonesa, entre otras.

Pensamos que el cobayo puede considerarse como un modelo experimental apropiado para un estudio comparativo con la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) humana, debido a que éste es un animal de laboratorio que ante la infección con la cepa XJ prototipo patógena del virus Junín presenta un cuadro hemorrágico muy semejante al del humano [3]. Por otra parte, el cobayo posee una placenta de tipo hemocoriónica con una sola capa trofoblástica similar en su estructura a la placenta humana [2], siendo el control endocrino de la gestación semejante al del hombre. En el cobayo el período gestante dura de 59 a 72 días, con un promedio entre 63 y 68 días.

En el presente estudio, usando como modelo experimental al cobayo investigamos, por una parte, la posible infección congénita en fetos y crías de cobayas infectadas con virus Junin en distintos tiempos durante su período de gestación. Por otra parte, tratamos de determinar si la lactancia es una de las vías de eliminación del virus que determine el consecuente contagio de las crías nacidas.

Con el propósito de determinar la trasmisión transplacentaria del virus Junin y la infección congénita de las crías, se utilizaron 22 cobayas en distintos períodos de gestación, todas las cuales se inocularon con 50-100 $DICT_{50}$ de la cepa XJ prototipo patógena del virus Junin por vía intrasmucular:

a) Un grupo de 11 cobayas se infectaron entre los 50-70 días de su período de gestación y tuvieron un total de 22 crías, el 18 % de las cuales murió con el cuadro hemorrágico típico de la FHA entre la tercera y cuarta semana después de la infección materna; el 54 % murió dentro del mismo período sin signos hemorrágicos evidentes y el resto nacieron muertas. Por lo tanto, murió el 100 % de las crías nacidas de madres infectadas al final de su período de gestación. Cualquiera fuese la circunstancia de su muerte o el cuadro presentado en el momento de la misma, se aisló virus en los macerados de los órganos de todas estas crías;

b) En un segundo grupo se infectaron 8 cobayas entre los 25-50 días de su período de gestación, obteniendo en el momento de su muerte 12 fetos con petequias evidentes y múltiples hemorragias, aislándose también en este caso virus Junin en todos los fetos;

c) En el tercero y último grupo se infectaron 3 cobayas cuya gestación no sobrepasaba los 20 días y los 4 fetos recuperados de las mismas en el momento de su muerte, no presentaron alteraciones macroscópicas visibles. Una sola cobaya de este grupo fue la única de las 22 inoculadas inicialmente que abortó 5 fetos antes de morir.

Todas las cobayas preñadas de estos 3 grupos murieron entre 13 y 25 días post-infección, presentando en el momento de su muerte el cuadro hemorrágico típico de infección del cobayo con virus Junin. Es de destacar que en todos los casos las hemorragias uterinas eran muy evidentes con múltiples petequias distribuidas en cervix, cuerpo y trompas del útero, y en los casos en que la muerte de la cobaya sucediese previa a la parición, estas petequias se observaron también en saco vitelino. Por otra parte, un análisis histopatológico preliminar de las placentas y los fetos demostró la presencia de lesiones y hemorragias.

Con el objeto de determinar si la lactancia es una de las vías a través de la cual podría producirse la infección perinatal en el cobayo, se inocularon 5 cobayas normales con 50-100 $DICT_{50}$ de la cepa XJ patógena del virus Junin por vía intramuscular luego de 2, 4, 6, 8 y 12 días posteriores al momento de la parición. Posteriormente, se dejó convivir a las madres infectadas con sus crías lactantes sin inocular hasta el momento de la muerte de las primeras. Las 5 madres murieron con cuadro hemorrágico típico. En el tejido glandular mamario de estas 5 cobayas, así como en 19 muestras de mamas de las cobayas utilizadas para determinación de la infección congénita, se aisló virus Junin. A partir del momento de la muerte de las cobayas madres, se observó que las crías sin inocular que habían convivido

durante el período de lactancia con sus madres infectadas murieron espontáneamente en el 84 % de los casos, el 50 % con cuadro hemorrágico típico y el resto sin signos hemorrágicos evidentes.

Los datos presentados en este trabajo, tales como: el cuadro hemorrágico típico observado en las crías nacidas de madres infectadas, la obserbación macroscópica de petequias y hemorragias en fetos en útero, el aislamiento de virus de fetos, placentas y órganos de crías nacidas de madres infectadas, así como placentas y fetos con alteraciones histopatológicas, nos permiten concluir que el virus Junin atraviesa la placenta e infecta a las crías.

Por otra parte, el aislamiento de virus de numerosas muestras de glándula mamaria y una mortalidad del 83 % de las crías lactantes, 50 % de las cuales presentaron cuadro hemorrágico típico en el momento de su muerte, confirma el hallazgo previamente mencionado de que la leche materna podría ser una importante vía de eliminación del virus Junin. Cabe aclarar que no descartamos la eventual participación de otras vías para la infección de las crías lactantes, sobre todo teniendo en cuenta la viremia y las hemorragias concomitantes que produce el virus Junin en el cobayo y el humano. Es importante destacar que, como se mencionó anteriormente, en sólo una de las 27 cobayas utilizadas en este trabajo, se produjo aborto durante su gestación.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permitieron comprobar la trasmisión transplacentaria del virus Junin en cobayos, y teniendo en cuenta la semejanza entre la enfermedad experimental de este animal con la del ser humano, pensamos que la infección congénita en el hombre con virus Junin debe ser considerada. Por otra parte, confirmamos que la lactancia podría ser una importante vía en la determinación de la infección perinatal en el cobayo, previamente descripta en el ser humano.

1. Catalano LW Jr, Sever JL: The role of viruses as causes of congenital defects. *Ann Rev Microbiol* 25: 255, 1971.
2. Enders AC: A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. *Am J Anat* 116: 29, 1965.
3. Guerrero LB, Boxaca MC, Weissenbacher MC, Frigerio MJ: Infección experimental del cobayo con virus Junin. Cuadro clínico, diseminación y eliminación del virus. *Medicina (Bs Aires)* 37; 271, 1977.
4. Maiztegui J, Voeffrey J, Fernández N, Barrera Oro J: Aislamiento de virus Junin a partir de leche materna. *Medicina (Bs Aires)* 33: 659, 1973.

Patricia M. Sangiorgio, Mercedes C. Weissenbacher

Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Frecuencia de tiroiditis linfocitarias crónicas como hallazgo circunstancial en autopsias

Después de leer las consideraciones que sobre nuestro trabajo hace el Dr. González Cueto en su carta al Comité de Redacción de *Medicina (Bs Aires)* 40: 492, 1980, nos sorprende y nos cuesta entender el "tono subido" de su carta. Desde un principio nuestro crítico manifiesta que su interés no está centrado en el tema del trabajo sino mostrar, a su juicio, los errores de los autores; achacándonos que para definir la tiroiditis linfocítica hemos utilizado el mismo criterio histológico que K. M. Saxena y J. D. Crawford sostuvieron en su trabajo sobre tiroiditis linfocítica juvenil, y que no es válido para ser aplicado a tiroides ocultas. Creemos que el Dr. González Cueto está equivocado al pretender desacreditar aspectos histológicos concretos, únicamente por razones de edad de los pacientes, dando a entender que desconoce la innumerable bibliografía que existe con respecto a las tiroiditis autoinmunes, y las diferentes terminologías empleadas por autores que trabajaron en el tema. Como resumen de esta bibliografía citaremos un párrafo de Volpé, R [1] en la página 996, subtítulo *Variant Forms:* "...*Various synonyms have been applied to these disorders, including chronic thyroiditis, lymphadenoid goiter, struma lymphomatosa, lymphocytic thyroiditis, Hashimoto's struma and autoimmune thyroiditis... Nevertheless, there is considerable genetic, functional and immunologic evidence to indicate that they may have a similar pathogenesis.*"

Otro cargo es el de "sobrevalorar resultados intentando obtener una particular frecuencia de tiroiditis entre los fallecidos de la Capital Federal". Creemos que 557 autopsias efectuadas en 18 años y provenientes de un hosipital general como el Hospital de Clínicas, es una buena muestra teniendo en cuenta el tipo de estudio al que nos referimos como para poder extrapolar los resultados a este ámbito.

Otros cargos se refieren a "citar erróneamente", "tergiversar el sentido de conclusiones ajenas", "escamotear al lector la explicación de otros autores", "malograr esfuerzos de terceros", etc. Si bien estimamos que nuestro crítico ha ido demasiado lejos, nos vemos en la obligación de esclarecer sobre los puntos que se nos plantea. Aparentemente entre las ideas fijas que el Dr. González Cueto nos deja traslucir de su carta, una de ellas se refiere a las tiroiditis focales. Parecería que nuestro crítico piensa que las tiroiditis focales y difusas son dos entidades nosológicas distintas, el Dr. González Cueto no se fijó que en el trabajo de Williams y Doniach [2], con el que tanto nos achaca, en la página 255, línea 18, dice: "..., *chronic thyroiditis, both focal and diffuse, is considered to be a manifestation of thyroid autoimmunity.*" Es por este motivo que no hemos puesto énfasis en distinguir ambas, máxime teniendo en cuenta que al poder revisar sólo uno o eventualmente dos tacos por cada glándula, no tendríamos en todos los casos suficientes elementos de juicio para hacer un distingo ca-

tegórico entre las formas difusas y focales. Sin embargo, nuestra prudencia al respecto contrasta con una suerte de clarividencia que tendría el Dr. González Cueto, ya que no tiene reparos en afirmar, y sin haberlas visto, lo siguiente: "...En 38 de estas 60 las tiroides eran macroscópicamente normales. Sería lógico pensar que al menos estas 38 fueron tiroiditis focales". En realidad no nos explicamos la cuenta de las tiroiditis realizadas por nuestro crítico, ya que si sumamos todas aquellas que cursaron con "glándulas macroscópicamente normales" nos da un total de 45, si sumamos sólo las tiroiditis linfocíticas nos da un total de 35, y si sumamos las tiroiditis de Hashimoto nos da un total de 10 (?) (ver líneas 16 y 18, columna 2, pág. 492 de la carta del Dr. González Cueto, y comparar con los resultados de nuestro trabajo [3] en la pág. 12). Pensamos que posiblemente nuestro crítico se refirió a las 35 tiroiditis linfocíticas calificadas por él como "focales", pero el Dr. González Cueto no se percató que el 66,6 % de las tiroiditis de Hashimoto diagnosticadas por nosotros fueron macrocópicamente normales a pesar de tratarse de una forma anatomopatológica más evolucionada de las tiroiditis linfocitarias crónicas. Con respecto al trabajo de Mortensen y col., debemos admitir que omitimos involuntariamente aclarar que el 1.2 % del total de autopsias correspondían a las tiroiditis nodulares macroscópicamente, y no al porcentaje de infiltrado linfocitario y "tiroiditis de Hashimoto" en glándulas clínica y "macroscópicamente normales" que fue del 6.5 % [4], parámetro que el Dr. González Cueto no tuvo la precaución de analizar. También nos critica el no haber realizado un estudio cuantitativo de las tiroiditis para comparar nuestros hallazgos con los de Williams y Doniach [2]; si se lee detenidamente el trabajo de estos autores, en la página 256, a partir de la línea 14 de Material y métodos dice: "... *The presence of follicle breakdown or oxyphil cell change was not considered a prerequisite for the diagnosis of focal thyroiditis although follicle breakdown was "almost" invariably, and oxyphil change "frequently" present in those cases with more than 10 foci per sq.cm*". Los resultados que obtuvieron estos autores con estos parámetros, fueron los que nosotros comparamos con nuestro trabajo, acorde a la definición de tiroiditis linfocítica que en un párrafo dice: "...infiltrado linfoplasmocitario que toma "todo" el tejido examinado en forma difusa o en focos, pudiéndose observar aunque en menor magnitud, hiperplasia celular oxífila..."; y con la tiroiditis de Hashimoto que para nosotros el parámetro más importante es la "destrucción folicular" [3]. Si al referirnos a la tiroiditis linfocítica dijimos que los infiltrados toman "todo" el tejido examinado, es lógico darse cuenta que las formas focalizadas alcanzaban o superaban los 10 focos por cm^2 de tejido, lo cual omitimos voluntariamente porque consideramos obvia la comparación acorde a nuestra interpretación. También queremos aclarar que, lamentablemente, se deslizaron en nuestro artículo un par de errores tipográficos que son: en la línea 1, columna 1 de la página 13 de nuestro trabajo dice: "...y que sería una progresión...", debiendo decir: "...y que no sería una progresión..."; y en la línea 13, columna 2, página 13, dice: "...100 000 fallecidos..." y debe decir: "...100 000 habitantes...". Como resulta obvio al lector, era muy fácil percatarse que lo que estaba así escrito en nuestro artículo no podía ser correcto ya que se contradecía con nuestros propios resultados que hasta un lego en la medicina hubiese reparado en ese error. Sin embargo, el Dr. González Cueto invirtió aproximadamente un 25 % de su carta para referirse a ellos y sacar sus propias conclusiones, pero queremos mostrarle cómo él también incurrió en su carta en errores tipográficos ya que cita en la línea 21, columna 1 de la página 493 a: "... Volpé, R.[1]", y no lo ubica en su lista bibliográfica como corresponde. Anteriormente citamos las "38 tiroiditis focales" que erróneamente relató el Dr. González Cueto en "dos oportunidades", queremos pensar que su error fue tipográfico y no de concepto.

No aceptamos el término de "escamotear" que usa el Dr. González Cueto para reprocharnos el no dar la interpretación sobre el trabajo del grupo de Rochester; creemos que el valor fundamental de ese artículo está en sus resultados aunque no compartamos totalmente la forma de interpretar los mismos por las características de nuestros resultados (ver línea 49, columna 1, página 13) [3]. Con respecto a la acusación que citamos mal ese trabajo aclaramos que en el mismo se remiten exclusivamente a la frecuencia de tiroiditis en mujeres, por lo tanto interpretamos que la población de referencia es de sexo femenino y no mixta.

Antes de dar por terminado este lamentable intercambio epistolar que no estuvo dirigido para ampliar nuestro conocimiento sobre el tema, originado por nuestro crítico, es digno de destacar el gran esfuerzo que le habrá llevado al Dr. González Cueto la pesquisa y lectura de nuestro material bibliográfico; aún así pensamos que ese precioso tiempo "gastado" por el Dr. González Cueto hubiera sido más productivo si se hubiese invertido para aportar más luz al intrincado problema de las tiroiditis.

1 Volpé R: Lymphocytic (Hashimoto's) thyroiditis. "The thyroid". 4th Ed. Edited by SC Werner and S Ingbar, Hagerstown, Harper-Row Book-Company, 1978, p 996.

2 Williams ED, Doniach I: The post mortem incidence of focal thyroiditis. *J Path Bact* 83: 255, 1962.

3 Harach HR, Niepomniszcze H: Frecuencia de tiroiditis linfocitarias crónicas como hallazgo circunstancial en autopsias. *Medicina (Bs Aires)* 40: 11, 1980.

4 Mortensen JD, Woolner LB, Bennett WA: Gross and microscopic findings in clinically normal thyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab* 15: 1270, 1955.

H. R. Harach, H. Niepomniszcze

* * *

Los autores de "Frecuencia de Tiroiditis linfocitarias crónicas como hallazgo circunstancial en autopsias"[4] se han preocupado más por el pelusas que por el contenido de mi crítica. Ante la posibilidad de no haber sido bien comprendido voy a volver sobre los puntos centrales en discusión procurando ser lo más breve posible.

Saxena y Crawford[5] describen una entidad anatomoclínica con características bien definidas que afecta a niños y adolescentes. Las tiroides examinadas por ellos estaban aumentadas de tamaño, difusamente, con o sin nódulos y tenían un color gris pálido característico. Histológicamente mostraban infiltrado difuso de linfocitos y plasmocitos, atrofia folicular y varios grados de degeneración celular (ver pág. 920). Leyendo esta descripción me llamó la atención que de 45 "tiroiditis linfocíticas" seleccionadas por los Dres. Harach y Niepomniszcze, de acuerdo con los criterios de aquellos autores[5], 35 (acepto mi anterior error al decir 38) fueron macroscópicamente normales, es decir, no estuvieron aumentadas de tamaño ni presentaron color gris pálido. Obviamente la diferencia macroscópica debiera estar relacionada con alguna diferencia microcópica y esa diferencia es probablemente la atrofia folicular que mencionan Saxena y Crawford[5] (pág. 920). Basta comparar la definición histológica de los Dres. Harach y Niepomniszcze[4] (pág. 11) con aquélla para comprender que no están definiendo la misma cosa. No vale que estos autores en su carta citen a Volpé para mostrar que hay varios sinónimos para estos desórdenes y que todos tienen una patogenia única. En ese caso para qué utilizar los criterios de Saxena y Crawford o, mejor aún, para qué definir subtipos de tiroiditis.

Vinculado con este aspecto de la definición está el controvertido punto de las tiroiditis focales o difusas. Williams y Doniach en su trabajo *The postmortem incidence of focal thyroiditis*[6] examinaron secciones de tiroides de casos de autopsia, evaluando en ellas el número de focos linfocitarios por cm^2. La mayoría de estas tiroides eran macroscópicamente normales (pág. 256). No soy yo sino Williams y Doniach quienes dividen las tiroiditis en focales y difusas. Evidentemente no porque piensen que son dos entidades diferentes sino porque esa división está en relación con la gravedad de la tiroiditis, más aún, existe una diferencia histológica entre los casos con más y con menos de 10 focos linfocitarios por cm^2. El autor recalca esta diferencia y los Dres. Harach y Niepomniszcze la citan literalmente en su carta. Consiste en la invariable presencia de la destrucción folicular en los casos con 10 o más focos por cm^2. Voy a citar un párrafo de la carta de los Dres. Harach y Niepomniszcze a propósito de los infiltrados linfocitarios de sus casos de "tiroiditis linfocítica". Dicen estos autores: "Si al referirnos a la tiroiditis linfocítica dijimos que los infiltrados toman "todo" el tejido examinado, es lógico darse cuenta que las formas focalizadas alcanzaban o superaban los 10 focos por cm^2 de tejido, lo cual omitimos voluntariamente porque consideramos obvia la comparación acorde a nuestra interpretación." Es sorprendente esta afirmación ya que entonces debemos considerar que las 60 "tiroiditis linfocíticas" tienen destrucción folicular y, por lo tanto, escaparían a la precisa definición que los Dres. Harach y Niepomniszcze dan a este subtipo y según la definición de los mismos autores recibirían el espaldarazo para pasar al subtipo "tiroiditis de Hashimoto". No es cierto que yo haya criticado a los autores por no haber hecho un estudio cuantitativo sino por no haber mencionado el estudio cuantitativo de Williams y Doniach[4] (ver pág. 492). Pienso que hubieran hecho bien en mencionarlo y buscar la forma de aclarar la evidente contradicción con el trabajo cuyos resultados, según afirman, coinciden en su mayor parte con los suyos.

Con respecto a mi crítica sobre la particular frecuencia de tiroiditis entre los fallecidos en la Capital Federal, quiero decir que no cito a Volpé en mi carta sino que menciono la cita de los Dres. Harach y Niepomniszcze. El número 3, después del nombre de Volpé, debió ser un 9, de acuerdo al orden bibliográfico del trabajo[4]. Los autores destacan este error tipográfico, según ellos, el que se desliza en la página 13 columna 2 de su trabajo, hecho lo cual cierran el debate sobre el punto más discutible de su publicación.

No voy a volver a enumerar los ingredientes de que está compuesto el gráfico (fig 1, pág 113) los que fueron bien especificados en mi carta anterior. Sólo quisiera saber cómo pueden los autores inferir el índice de mortalidad para tiroiditis por 100 000 habitantes, a partir de un promedio anual de 3 "tiroiditis" en 28 ó 30 autopsias entre los años 1961 y 1978 de un hospital de referencia con internados de distintos lugares del país, y del índice de mortalidad para la Capital Federal de los años 1959-61. Cómo pueden los autores suponer que el índice de tiroiditis de Hashimoto, clínicamente diagnosticadas en mujeres en Rochester-Minnesota 1967, es comparable a los índices de mortalidad para "tiroiditis linfocítica" diagnosticada histológicamente por ellos en la ciudad de Buenos Aires, y que a su vez sobre aquel índice se puede aplicar la proporción 10 a 1 para mujeres y varones que da Volpé lo que serviría a su vez para tomar el índice de varones con tiroiditis de Hashimoto diagnosticadas, etc., etc. ... Creo que el gráfico no resiste el análisis y que el adjetivo "particular" tal vez no sea el que más cuadre al resultado que de él se pretendió obtener.

Para terminar, quiero decir que este intercambio epistolar no es a mi juicio lamentable sino saludable y que no es esfuerzo malgastado

todo aquel que contribuye a mejorar el nivel de las publicaciones nacionales.

[4] Harach HR, Niepomniszcze H: Frecuencia de tiroiditis linfocitarias crónicas como hallazgo circunstancial en autopsias. *Medicina (Bs Aires)* 40: 11, 1980.

[5] Saxena KJ, Crawford JD: Juvenile Lymphocytic thyroiditis, *Pediatria* 30: 917, 1962.

[6] Williams ED, Doniach I: The post mortem incidence of focal thyroiditis, *J Path Bact* 83: 255, 1962.

[7] *Medicina (Bs Aires)* 40: 492, 1980.

D. González Cueto

Determinación específica de inmunocomplejos circulantes por métodos inmunoenzimáticos en sueros humanos de chagásicos crónicos.

A partir de la descripción efectuada por Cossio y col. (*Circulation* 49: 13, 1974) del factor EVI, el desarrollo de métodos sensibles y específicos que permitan la detección de inmunocomplejos circulantes en infectados chagásicos presenta una gran importancia para el estudio de la patología de la enfermedad. Los avances operados en los últimos años en el terreno de la inmunoenzimología permiten concebir una metodología que podría posibilitar el hallazgo de tales inmunocomplejos, una vez resuelto el problema de la caracterización y purificación de los antígenos responsables de su formación.

Recientemente, Marcipar y col. (*Parasite Immunology,* 1981, en prensa) han descripto la purificación por cromatografía de afinidad sobre lectinas (PNA) de glicoproteínas fuertemente antigénicas, a partir de formas de cultivo de *Trypanosoma cruzi.* Estudios de inmunofluorescencia realizados sobre las formas tripomastigote y amastigote del mismo parásito, demuestran, por otra parte, la presencia en ambas de dicho complejo glicoproteico sobre las membranas exteriores (Johnson y Eisen, comunicación personal). Utilizando estas fracciones antigénicas hemos procedido a la inmunización de cobayos y purificamos los anticuerpos correspondientes por cromatografía de afinidad sobre Sepharosa-CNBr-glicoproteínas de *T. cruzi.* Estos anticuerpos fueron inmovilizados sobre sus grupos carboxilo libres, utilizando poliamida 6 como soporte y 1-6 diisocianohexano como ligante (Goldstein y col., *Biochem J* 143: 497, 1974; Marcipar y col., *IRCS Medical Science* 7: 178, 1979).

Sueros humanos de chagásicos crónicos y de sujetos con respuesta serológica negativa para enfermedad de Chagas, fueron tratados con IgG desnaturalizada de cabra (Maiolini R. y Masseieff, R (*J Immunol Methods* 8: 223, 1975) de manera de eliminar reacciones debidas al factor reumatoideo. Diluciones entre 1/2 y 1/1024 de estos sueros fueron incubadas cada una con una superficie de 1 cm^2 de los inmunoadsorbentes preparados como se ha descripto más arriba. La IgG humana inmovilizada en asociación con los antígenos reconocidos por el inmunoadsorbente fue determinada por medio de la reacción ELISA a sensibilidad aumentada, usando para el revelado un conjugado de anticuerpos anti IgG humana-β-D-galactosidasa (Ishikawa y col., *Scand J Immunol* 8: 43, 1978).

Los resultados muestran que en una alta prevalencia, variable según el origen geográfico de los sueros, en los pacientes chagásicos es posible encontrar por este método, inmunocomplejos solubles presentando IgG asociada a glicoproteínas de *T. cruzi.* Los sueros correspondientes a personas no chagásicas dieron en todos los casos respuesta negativa para esta reacción.

Estos resultados sugieren así una metodología accesible y específica para la determinación de complejos inmunes en la enfermedad de Chagas, posibilitando el estudio de la correlación entre la presencia de dichos complejos, el estado clínico y la evolución de los pacientes.

A. J. Marcipar, E. Lentwojt, M. L. Streiger

Institut de Technologie des Surfaces Actives, Université de Compiègne, Francia, y Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales Dr. Ramón Carrillo, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe,

Estilo de las cartas

Los artículos científicos tienen un estilo riguroso e impersonal tradicionalmente establecido que seguimos casi todos los que periódicamente comunicamos resultados de investigaciones realizadas. Sin embargo, hay quien ingeniosamente nos ha hecho ver, en los últimos años, cuanto más útil sería que los autores usaran un lenguaje más cerca de la realidad de los hechos (Julius Comroe: *The Retrospectroscope*, 1977). Parecía, por lo menos hasta ahora que existía mayor libertad en el estilo posible de ser utilizado en una carta como las comentadas (*Medicina (Bs Aires)* 41: 123, 1981). No creo inconveniente que se exteriorice cierta pasión en la polémica acerca de lo que uno u otro cree. En primer lugar es evidente que si se traspasara cierto límite el Comité de Redacción no aprobaría la publicación de la Carta. Además, y creo que esto es más importante, en nuestro país las mayores pasiones se vinculan hoy a la economía, la política o a los espectáculos deportivos. El hecho de que algunos, conserven aún fuerzas para apasionarse en torno a discrepancias científicas no debería ser motivo de crítica por los partidarios de un lenguaje aséptico, a través del cual se disimulen las emociones. Sería deseable, por el contrario, que la búsqueda de la verdad, no sólo en ciencias, apasionara más a los argentinos.

A. J. Roncoroni

Linforma de Burkitt y su diagnóstico morfológico

He leído con sumo interés la Reunión Anatomoclínica publicada bajo el título "Linfoma de Burkitt y coma metabólico" (*Medicina (Bs Aires)* 41: 82, 1981) y, dejando de lado la certeza del diagnóstico histopatológico de ese caso, quisiera subrayar que el mismo no se debe realizar solamente con el hallazgo de una proliferación linfoblástica poco diferenciada "de aspecto monomorfo con áreas blancas dadas por los macrófagos" "que le dan el clásico aspecto de "cielo estrellado" (ambos párrafos del texto de la Reunión), como parece desprenderse del texto en cuestión.

Los requisitos que exige la OMS (Berard y col., *Bull WHO* 40: 601, 1969) incluyen:

1) Células linfoides uniformemente inmaduras, con cromatina nuclear finamente granulosa y uno o dos nucléolos evidentes, y citoplasma basófilo.
2) Presencia de grandes histiocitos espumosos no neoplásicos, produciendo el denominado patrón en "cielo estrellado". (Ambas características citadas en el artículo).
3) Fuerte pironinofilia citoplasmática de las células linfoides, uniforme en todo el tumor.
4) Presencia de vacuolas lipídicas en las células tumorales, mejor demostradas como gotículas de lípidos en cortes por congelación teñidos con colorantes para grasas neutras. (Estas dos últimas características no se mencionan en el artículo en cuestión).

La existencia de patrón en "cielo estrellado" por otra parte, no siempre es bien evidente (Wright, D. H., *Pathology Annual* 6: 337, 1971; Braylan y col., *Pathology Annual* 10 213, 1975) y, además, otros linfomas no-Burkitt pueden presentarlo (Braylan y col., ídem). *This feature is, however, not pathognomic of the Burkitt lymphoma since it occurs in a significant proportion of the more common "Burkitt-like" poorly differentiated lymphocytic lymphomas* (Henry, K. y col., *Recent Advances in Histopathology* 10: 275, 1978).

En mi experiencia (Drut, R., *Medicina (Bs Aires)* 38: 159, 1978) el punto 4 parece ser altamente característico de este linfoma aun en ausencia de la imagen del punto 2.

R. Drut

Servicio de Anatomía Patológica,
Hospital de Niños, La Plata

— — — —

A todos nos enseñan lo que es ciencia, y lo olvidamos al tiempo mismo que lo estamos aprendiendo, en un solo acto. Olvidamos que la ciencia es algo vivo, en vías de formación siempre, con su fondo formado y eterno y su proceso de cambio.

Miguel de Unamuno (1864-1936)
En torno al casticismo, 1916

COMENTARIOS BIBLIOGRAFICOS

Difenilos y Trifenilos Policlorados. Criterios de Salud Ambiental 2. Organización Panamericana de la Salud, O.M.S., Publicación Científica Nº 387, 1979, 90 pp.

En el año 1975 se reunió en Copenhague un grupo de trabajo de la OMS para evaluar los efectos y establecer criterios de salud ambiental aplicables a los Difenilos y Trifenilos Policlorados (DPCs y TPCs). La producción de estas sustancias en forma comercial comenzó en el año 1930 y los primeros informes sobre intoxicación se comunicaron entre trabajadores que preparaban esos productos. Las manifestaciones tóxicas descriptas entonces fueron: erupciones acneiformes y pocos casos de insuficiencia hepática con consecuencia letal. La distribución de los DPCs en el medio ambiente no se reconoció hasta que Jensen en 1964 logró determinar los orígenes de picos desconocidos durante la separación cromatográfica en gas líquido de plaguicidas organoclorados. Desde entonces las investigaciones realizadas en distintas partes del mundo han puesto de manifiesto la distribución generalizada de los DPCs en muestras ambientales. La concentración mayor se determinó en áreas industriales. Se estima que la producción mundial de los DPCs desde 1930 es de un millón de toneladas aproximadamente, de esta cantidad más de la mitad se ha incorporado a vaciaderos en los que probablemente permanezca estable pues la degradación es mínima y el resto se ha incorporado al medio ambiente, ríos, aguas litorales, atmósfera, a esta última principalmente por la incineración de los vaciaderos.

Los DPCs son bien absorbidos por los mamíferos y se acumulan principalmente en el tejido adiposo; los estudios de tejido adiposo humano en distintos países mostraron que la mayor parte de las muestras contienen niveles de DPCs de alrededor de 1 mg/kg; valores de hasta 700 mg/kg se detectaron en tejido adiposo de hombres expuestos profesionalmente. Los más afectados son trabajadores de la industria eléctrica (condensadores eléctricos) mecánicos que están en contacto con aceites lubricantes y fluidos hidráulicos, pintores, oficinistas (papel copia sensible a la presión). La información de los efectos de los DPCs en el hombre se ha obtenido de un episodio de grandes proporciones ocurrido en Japón (Yusho), donde más de mil personas manifestaron signos de intoxicación a causa de la ingestión de aceite de salvado de arroz contaminado. Los efectos más notables fueron hipersecreción ocular, pigmentación cutánea y erupciones acneiformes. Los hijos de madres intoxicadas fueron de menor tamaño que los normales. Las áreas geográficas donde se determinó mayor concentración de DPCs en el medio ambiente y en los alimentos fueron: EE.UU., Europa y Japón. Desde 1970 se comprobó en Suecia la contaminación con DPCs en los siguientes alimentos: manteca, margarina, aceites vegetales, huevos, carne vacuna, cordero, pollo, pan, galletas y alimentos para bebés. Los valores más elevados se observaron en peces, según el contenido de grasa y la contaminación de la zona de pesca. Otras fuentes de exposición a los DPCs son los materiales que se emplean como plastificantes, masillas selladoras, adhesivos para revestimientos, impermeabilizantes de muros y en la producción de tintas de impresión.

La presente publicación de la Organización Panamericana de la Salud analiza en 90 páginas el metabolismo, transporte y transformación en medio ambiente de los DPCs y TPCs, describe los riesgos para la salud y estudios epidemiológicos y clínicos con dichas sustancias. La bibliografía sobre el tema es prácticamente completa hasta el año 1975.

Muir's Textbook of Pathology. 11º Edition, J. R. Anderson (Ed), Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, 1980, 1112 pp, 1200 fig, £ 19.75.

Esta es la undécima edición de un texto de patología cuya primera apareció en 1926; casi todas han tenido reimpresiones y el libro ha sido traducido al italiano, portugués y castellano. La primera edición fue de un autor, Robert Muir, desde la sexta (1951) han sido revisadas por sus discípulos; al comienzo sólo uno, la presente tiene un editor y 15 colaboradores. Estos son descendientes de la escuela de ese formidable escocés que vivió 95 años (1864-1959), fue profesor de Patología en la Universidad de Glasgow de 1899 a 1936 y que casi coloca en todas las cátedras de Patología (y algunas de Bacteriología y Clínica) de Gran Bretaña a discípulos suyos. Es un clásico para los británicos y está destinado a los alumnos de Medicina y a los médicos recién graduados que se inician en cualquier especialidad; no es un libro de consulta. El comentarista agrega que es también útil para que cualquier patólogo con muchos años

en la especialidad se mantenga al día en temas a los que no se dedica especialmente y refresque o adquiera nuevos conocimientos. Hay capítulos útiles a odontólogos, veterinarios, biólogos y cualquier curioso de la naturaleza. El libro cubre la parte general y la parte especial o sistemática. Hay un capítulo de introducción, 12 de patología general y 14 de patología especial. Todo esto en 1085 páginas de texto con alrededor de 1200 ilustraciones y diagramas y un índice de 26 páginas de tipo pequeño; este índice sin fallas. Los autores han conseguido lo que se propusieron, la selección de los tópicos y la profundidad con que están tratados creemos que son las adecuadas para los destinatarios. Los capítulos contienen la información necesaria para conocer y entender, cuando esto es posible, los temas que se tratan. Están escritos con una claridad y brevedad notables en un texto. Algunos ejemplos: la etiología y patogenia del ateroma (así llaman a la aterosclerosis) están tratadas en poco más de dos páginas y todos los factores son considerados aún los últimos gritos de la moda. Igualmente ocurre en los capítulos de inflamación, patología renal, respiratoria, digestiva y hepática, sólo por mencionar aquellos que el comentarista escudriñó con mayor atención. Con pocas palabras los autores consiguen decir mucho; es un texto completo. La lectura es amena, los tipos claros, aun los pequeños del índice, el papel es fuerte y sin brillo, las fotografías y diagramas cumplen su función. Hay algunos errores tipográficos que uno no quisiera que hubieran. Cada capítulo tiene una pequeña lista de referencias bibliográficas y orientación para lecturas más completas; recordemos a quienes está dirigido el libro. Nuestros males "geográficos" no están casi tratados, de hidatidosis sólo se menciona la forma hepática, la enfermedad de Chagas sólo se menciona en megaesófago, no entre las cardiopatías, no hay referencias a las fiebres hemorrágicas. El ejemplar que recibimos es de tapa blanda, la encuadernación parece buena, ha resistido unos meses de llevarlo y traerlo de un lado para otro y sólo ha sufrido en las puntas; esto se corrige forrándolo prolijamente. En la tapa y contratapa hay lindas ilustraciones, en la contratapa está indicado el precio en libras esterlinas; es una buena compra. Contagiados por este buen ejemplo de parsimonia escocesa, terminamos diciendo: cómprelo, vale lo que cuesta.

Hunger disease. Studies by the Jewish Physicians in the Warsaw Ghetto. Myron Winick (Ed). Traducido del polaco por Martha Osnos. Current concepts in nutrition, Vol 7, John Wiley, 1979, 260 pp.

Este libro es un documento único en la historia de la investigación clínica, pues fue realizado por 28 médicos sometidos al proceso que ellos estudiaron: la desnutrición. De estos 28 médicos, 19 no existían al año de interrumpir el estudio. Por lo tanto, es un libro que puede leerse a dos niveles, como documento científico y como testimonio de un comportamiento heroico. En el año 1940 varios cientos miles de personas que habitaban el Ghetto Judío de Varsovia, fueron aislados del mundo exterior y sometidos a un régimen de desnutrición sistemática. El doctor Israel Milejkowski, médico responsable de la salud pública del ghetto propone a las figuras médicas más prominentes (algunos de ellos notables especialistas en su área) documentar y encontrar solución al problema de la desnutrición generalizada que soportaba la población entera y donde las infecciones en general y la tuberculosis en particular diezmaban a la misma. Resulta imposible pensar en condiciones adversas mayores que las enfrentadas por esos investigadores para efectuar los estudios dentro de los muros del ghetto. Fue necesario trabajar y reunirse en secreto, entrar de contrabando drogas, aparatos y todo el material necesario pues los hospitales contaban con el mínimo de material y finalmente, cuando el estudio es interrumpido, deben esconder los resultados para impedir su destrucción.

En 1946 apareció una edición limitada de los manuscritos en polaco y en francés. En 1978 se realizó en el Colegio de Médicos y Cirujanos de Nueva York un Simposium, donde se destacaron los hallazgos más importantes del estudio y se realizó un homenaje a sus autores. Posteriormente el Dr. M. Winick, director del Instituto de Nutrición Humana de la Columbia University, decidió traducir todos los manuscritos existentes del polaco al inglés y editarlos con comentarios actualizados en todos los tópicos estudiados.

Los distintos capítulos comprenden: cambios clínicos de la desnutrición en adultos y niños; adaptaciones metabólicas que incluyen estudios sobre hidratos de carbono, metabolismo ácido-base y metabolismo nitrogenado, este último, aunque incompleto, es un formidable documento teniendo en cuenta la dificultad que significaba hacer estudios de balances en condiciones tan adversas; cambios circulatorios que incluye presión arterial y venosa, tiempo circulatorio, volumen sanguíneo, consumo de oxígeno y trabajo cardíaco; cambios en sangre y médula ósea; cambios en ojos y visión, donde se describen por vez primera procesos patológicos oculares secundarios a la desnutrición, como ser: cambios en el cristalino similares al tipo de la catarata senil, disminución importante de la presión intraocular (50 %), y aparición de esclerótica azul. Del estudio de cambios en el campo visual, no fueron encontrados los manuscritos. El capítulo final estudia la anatomía patológica a través del examen macro y microscópico y describe cambios en órganos y tejidos como no había sido documentado antes.

El trabajo es interrumpido bruscamente en julio de 1942; en ese mes, comenzaron las deportaciones en masa hacia los campos de concentración y los médicos fueron dispersados. El director del trabajo, Dr. Israel Milejkowski, escribe en octubre de ese año lo que será el conmovedor prólogo de la obra que termina con la frase: *Non Omnis Moriar* y, meses más tarde, viendo claramente su futuro, se suicida.

Endocrinology in anaesthesia and surgery. H. Stoeckel, T. Oyama (Eds), con la colaboración de G. Hack. Springer-Verlag, Berlin, 1980, 203 pp.

Los cirujanos y anestesistas darán la bienvenida a este libro. Cuando lo lean verán qué pasa detrás de las bambalinas mientras desarrollan en el escenario sus operaciones y anestesias. Lo que pasa concierne al sistema endocrino y a la repercusión metabólica y humoral de la propia intervención quirúrgica y de los anestésicos, según lo expuesto en el Primer Simposio Internacional sobre Endocrinología en Anestesia y Cirugía, celebrado en Bonn, Alemania Federal, en setiembre de 1978. Intervinieron 37 autores de Europa Occidental, los Estados Unidos y Japón. Entre los temas generales se incluyen excelentes revisiones, breves y actualizadas, sobre la regulación del sistema endocrino, el dosaje de hormonas, los aspectos hormonales de la hipertensión arterial y los cambios endocrinos que acompañan al shock. La repercusión endocrina de la cirugía y/o anestesia son expuestos en muy buenas colaboraciones sobre influencia de la anestesia y la operación sobre el sistema endocrino, y en particular sobre las catecolaminas, hormona antidiurética, sistema renina-angiotensina-aldosterona, prolactina, esteroides sexuales y durante la administración intraoperatoria de fluidos. Varios trabajos exponen, en forma actualizada y resumida, la cirugía y la anestesia en la hipofisectomía, paratiroidectomía, feocromocitoma, pancreatectomía y timectomía (myasthemia gravis). No se dejan de lado las reacciones metabólicas a la cirugía y la anestesia, dedicándoseles trabajos al equilibrio hormonal durante la administración de fluidos y a los efectos del bloqueo neurogénico sobre la reacción metabólica determinada por la cirugía. También se analiza el uso de agentes anticatabólicos y anabólicos para contrarrestar el efecto catabólico de la intervención quirúrgica. Un buen trabajo trata la anestesia en enfermos que se hallan bajo la acción del tratamiento con corticoides. Para el anestesista, el libro ofrece el atractivo de considerar los diferentes efectos de diversos agentes anestésicos. La concisión es uno de los méritos de este libro, que reúne una buena y actualizada bibliografía europea, norteamericana y japonesa. En el breve tiempo que le dejan libre sus absorbentes actividades, es seguro que ni cirujanos ni anestesistas perderán el que dediquen a su lectura. La elegancia de la presentación editorial es otro mérito que debe señalarse.

Accomplishments in Cancer Research 1979. J. G. Fortner, J. E. Rhoads (Eds), J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1979, 146 pp.

General Motors Cancer Research Foundation otorgó por primera vez en 1979 sus premios anuales, instituidos para destacar los méritos de los investigadores, tanto clínicos como básicos, que más se han destacado en el estudio de la causa, la prevención y el tratamiento del cáncer. Los premios consisten en una medalla de oro y U$S 100 000 y son tres por año: el Premio Charles F. Kettering, para la contribución más destacada en el diagnóstico o tratamiento del cáncer; el Premio Alfred P. Sloan, para etiología y patogenesis del cáncer, y el Premio Charles S. Mott para la prevención del cáncer. De hecho se da crédito así a tres grandes benefactores que formaron parte del Comité Ejecutivo de *General Motors*, dos de los cuales fundaron el *Sloan-Kettering Cancer Institute.* Después de un largo proceso de selección, en el cual participaron 25 destacados científicos internacionales, se eligieron los tres premiados: el Dr. Henry S. Kaplan, de Palo Alto, California; Sir Richard Doll, de Oxford, Inglaterra, y el Dr. George Klein, de Estocolmo, Suecia. Este librito contiene la historia de la institución de estos premios, su modo de selección, las palabras de presentación y aceptación de cada premio, con fotografías en color, y las conferencias, en toda su extensión, de los tres premiados. Esto último es lo que realmente le da mucho valor al libro, ya que las tres disertaciones no dejan duda sobre el vuelo científico de cada autor, y sirven de puesta al día sobre los tres temas. Kaplan hace una reseña histórica de la enfermedad de Hodgkin seguida de los conceptos actuales sobre su naturaleza, su tratamiento y su pronóstico. Es con interés que uno puede seguir cómo se fueron desarrollando los métodos de irradiación, hasta llegar al acelerador lineal —del cual Kaplan es co-inventor— y a la cirugía exploratoria y esplenectomía, para añadir en los últimos años la quimioterapia; así fue que se llegó al 95.8 % de sobrevida a los 4 años con este tratamiento combinado. En cuanto a la naturaleza del defecto inmunológico que acompaña a la enfermedad de Hodgkin, se trataría de una alteración de la inmunidad celular acompañada de factores humorales capaces de inhibir el funcionamiento normal de los linfocitos T. Doll, por su lado, comenta la historia de la epidemiología del cáncer, su participación en el descubrimiento del tabaco y del amianto o asbestos como causas del cáncer de pulmón, poniendo énfasis en la importancia de seguir acumulando datos epidemiológicos, los que llevarán a reconocer las substancias con riesgo de producir cáncer en poblaciones determinadas. Finalmente, Klein contrasta las participaciones del huésped y del tumor en el control inmunológico y no-inmunológico del desarrollo neoplásico. Es una brillante disertación que va desde el concepto de surveillance inmunológica hasta el control genético que determinaría la efectividad del antígeno tumoral. Insiste mucho en el significado de los cambios cromosómicos que acompañan a la evolución de ciertos tumores como la leucemia mieloide crónica, ciertos linfo-

mas y especialmente el de Burkitt. Con sus colaboradores, Klein ha aportado muchos datos de importancia para empezar a entender la etiopatogenia del linfoma de Burkitt: sugiere la participación de tres factores, el virus EBV (Epstein-Barr) que transformaría los linfocitos B, el paludismo que llevaría a la estimulación crónica de estos linfocitos B aumentando la probabilidad de un cambio citogenético capaz de ocasionar una translocación 8;14, después de lo cual se desarrollaría la enfermedad. Los hematólogos y cancerólogos que se interesan en estos problemas encontrarán fascinantes las exposiciones de estos tres pilares de la investigación oncológica.

The treatment of mycosis with imidazole derivatives. W. P. E., Raak, Springer, Berlín, 1980, 157 pp.

Se trata de una obra escrita originalmente en alemán y traducida al inglés por T. C. Telger. En su parte inicial destina varios capítulos a una revisión y actualización sobre el empleo de antimicrobianos de uso local en la piel y las membranas mucosas. Seguidamente desarrolla en forma bastante completa las características químicas, farmacológicas y el mecanismo de acción antimicrobiano de los diversos compuestos imidazólicos. Hace también un estudio comparativo, en base a datos propios y extraídos de la bibliografía, de la eficacia de diversos antifúngicos y antimicrobianos de uso local y los imidazólicos. Considera a estos últimos como los más eficaces debido al alto índice de curaciones clínicas y micológicas alcanzadas (entre el 80 y 95 %), la imposibilidad de la aparición de resistencia microbiana generada por su aplicación, su excelente tolerancia y amplio espectro de acción antifúngica y sobre bacterias gram positivas. Al analizar los resultados observados con el clotrimazol, miconazol y econazol se inclina por este último compuesto, debido a su mayor eficacia frente a bacterias gram positivas y a su gran capacidad de penetración en las capas profundas de la piel. Se refiere también, aunque en forma mucho más breve, al empleo de los derivados imidazólicos como antifúngicos de uso sistémico. Detalla el metabolismo, niveles sanguíneos y tisurales y efectos tóxicos observados con la aplicación intravenosa del miconazol, oral e intravenosa del econazol y bucal del ketoconazol. Considera a este último como el más promisorio de los derivados imidazólicos para obtener un efecto antifúngico general. Los últimos capítulos están destinados a destacar la importancia de las micosis en las diversas ramas de la medicina, su incremento en los últimos años y expone sobre la utilidad de los imidazólicos en su tratamiento y control. Se dedica más detalladamente a estudiar sus aplicaciones en dermatología y ginecología. Resultan igualmente muy interesantes los estudios realizados sobre el empleo conjunto de corticoides e imidazólicos, sus indicaciones y los consejos prácticos dados para su administración.

Es un libro claro, didáctico y bastante completo. Contiene una gran información. Si alguna crítica puede hacérsele es el escaso espacio destinado al tratamiento de las micosis sistémicas (muy importantes en nuestro medio, pero de escaso interés en Europa central) y la ausencia en las citas bibliográficas de los trabajos latinoamericanos (sólo menciona uno). Es de destacar que las investigaciones clínicas realizadas en nuestro continente han contribuido, en gran medida, a comprender la utilidad e indicaciones de los derivados imidazólicos como antifúngicos de acción general.

Cancer Centers. Interdisciplinary care: and cancer epidemiology. E. Grundmann, J. W. Cole (eds), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1979, 287 pp.

Se trata de una publicación que incluye los resúmenes de las ponencias presentadas en el X Simposio Internacional de Centros de Cáncer. A través de la lectura de los diversos trabajos se puede conocer la organización de diversos centros estadounidenses, europeos y japoneses, así como los procedimientos empleados por los diversos grupos en la recolección de datos para el funcionamiento de los Registros de Tumores. Finalmente, varios capítulos explican el funcionamiento de diversos grupos cooperativos y hay una serie de ponencias sobre aspectos etiológicos y terapéuticos del cáncer, utilizando el método epidemiológico.

Los temas abordados son de interés para especialistas en administración hospitalaria o para aquellos que organizan o dirigen un centro oncológico. Se trata de una variedad de temas expuestos en forma caótica y desordenada, que lo torna poco atractivo para el oncólogo, a quien está destinado. El título debería modificarse por el menos rimbombante de "Anales del X Simposio de Centros del Cáncer".

Distinguido Doctor

Tenemos el agrado de anunciar al cuerpo médico argentino la presentación de FLOVACIL, nueva especialidad medicinal de Laboratorios Andrómaco, cuyo principio activo es el DIFLUNISAL.

Este novedoso analgésico antiinflamatorio, derivado del ácido salicílico, aporta por su mayor potencia, excelente tolerancia y acción más prolongada, un real avance en el tratamiento de todo proceso doloroso.

Podemos afirmar que FLOVACIL es, en términos de eficacia y seguridad, el salicilato analgésico antiinflamatorio, probadamente superior.

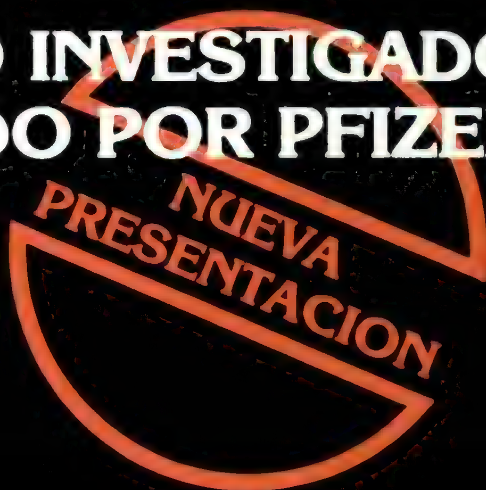
Flovacil se presenta en envases de 10 y 40 comprimidos recubiertos conteniendo cada uno 500 mg de Diflunisal, siendo la dosis de orientación de 500 a 1000 mg al día.

Quedamos a su disposición para ampliar la presente información y aprovechamos la oportunidad para saludar a Ud. muy atentamente.

Servicio de Información del Departamento Médico de Laboratorios Andrómaco

e* 20 mg
oxicam)

ANTIREUMATICO INVESTIGADO Y DESARROLLADO POR PFIZER



COMODO:

Una cápsula diaria de Feldene* 20 mg, asegura la colaboración del paciente y la continuidad del tratamiento.

SEGURO:

EFICAZ: Feldene* 20 mg antireumático efectivo en afecciones crónicas y agudas.[1]

BIEN TOLERADO: Menor capacidad ulcerogénica que otras formas de piroxicam.[2] Por su excelente tolerancia Feldene* 20 mg es mejor aceptado por pacientes tratados anteriormente con otros agentes.[3]

BIBLIOGRAFIA:
1.- Shoog, M.: Datos en archivo
2.- Pitts, N.E. y cols.: Efficacy and safety of piroxicam. Int. Cong. and Simposyum Series, Pfizer Central research, San Francisco, California, june 30, 1977, pag. 97.
3.- Dessain, P. Estabrooks y cols.

PRECIO AL PUBLICO INCLUIDO I.V.A. 1/7/81
FELDENE 10 mg x 20 cáp. $ 75.162
FELDENE 10 mg x 50 cáp. $ 178.690
FELDENE 20 mg x 20 cáp. $ 164.328

* Marca de PFIZER Inc.

MEDICINA (BUENOS AIRES)
FUNDADA EN 1939

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

REVISTA BIMESTRAL
(Registro de la Propiedad Intelectual Nº 87.075)

Publicada con el apoyo del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

MEDICINA no tiene propósitos comerciales. El objeto de su creación ha sido propender al adelanto de la medicina argentina. Los beneficios que pudieran obtenerse serán aplicados exclusivamente a este fin

Aparece en Current Contents, Biological Abstracts, Index Medicus y Excerpta Médica

REGLAMENTO DE PUBLICACIONES

MEDICINA *publica trabajos de medicina clínica o experimental, entendiéndose este término en el más amplio sentido de la palabra. Los artículos a publicarse deberán ser originales e inéditos aunque serán también aceptados aquellos que hubieran sido comunicados en sociedades científicas o publicados en forma de «resúmenes». En caso de haber sido presentado a la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, corresponderá mencionarlo citando la fecha de la reunión.*

La redacción se reserva, además, el derecho de introducir —con el conocimiento de los autores— todos los cambios editoriales exigidos por las necesidades tipográficas, la compaginación, el reglamento de publicaciones o por razones económicas.

Casuísticas, Adelantos en Medicina, Artículos Especiales y *Cartas al Comité de Redacción* serán publicados en castellano. Los *Artículos Originales* podrán redactarse en castellano o en inglés indistintamente. Los manuscritos deberán ser escritos a máquina, a doble espacio, y enviados por duplicado.

Las *historias clínicas* serán expuestas sintéticamente. Protocolos, registros, etc., sólo se reproducirán si ilustran significativamente el texto.

Las *tablas*, presentadas en hojas individuales, deberán estar numeradas, ser indispensables y comprensibles por sí mismas, y poseer un título claramente explicativo de su contenido. Sólo se permitirá una superficie total de tablas equivalente a una página de la Revista: todo excedente estará a cargo del autor.

Las *figuras* comprendiendo ilustraciones de cualquier naturaleza (radiografías, fotografías, registros, etc.), se presentarán numeradas correlativamente. En su parte posterior llevarán una inscripción a lápiz que permita identificarlas. Cada figura tendrá una leyenda explicativa. Debe evitarse la superposición de tablas y figuras.

La *bibliografía*, presentada en hoja aparte, deberá limitarse a aquellos artículos directamente relacionados con el trabajo mismo, evitándose las revisiones bibliográficas extensas que sólo serán aceptables en la sección *Adelantos en Medicina.* Las referencias se presentarán numeradas, en orden alfabético de autores *con los títulos de las publicaciones.* Los nombres de la revista figurarán en forma abreviada según el Index Medicus (ej.: J. Clin. Pathol. 19: 391, 1960). Los libros deberán figurar con su título, editor, ciudad y año de aparición.

Resumen: El trabajo deberá presentar un resumen de unas 200 palabras. *Además, contendrá un resumen más explicativo (de hasta 700 palabras) en inglés, con su título completo y con referencias a las figuras y tablas.*

Con motivo del constante aumento de los costos de edición, la Revista se hará cargo solamente de la impresión de 4 páginas (incluyendo tablas y figuras) para cada artículo original. Los autores deberán abonar los gastos que demande la mayor extensión de sus trabajos. El Comité de Redacción se reserva el derecho de solventar totalmente aquellos artículos de investigación clínica que considere de especial interés.

Se ruega enviar dirección postal y número de teléfono particular para facilitar el envío de pruebas de galera.

Secretaría y Redacción (de 8.30 a 17 hs.): Ana G. de Delisio, Instituto de Investigaciones Médicas, Donato Alvarez 3150, 1427 Buenos Aires. T. E. 52-0061/64.

Suscripción	Argentina	$	140.000
	Con cobrador a domicilio	$	155.000
	Números sueltos	$	30.000
	Extranjero	u$s	35

Correo Argentino — Central "B" — Franqueo pagado, Concesión Nº 856 — Tarifa reducida, Concesión Nº 666

Publicidad: Dr. Horacio J. Delisio, T. E. 52-0061/64
Sra. Nélida B. de Pecoraro

Las suscripciones corresponden de enero a diciembre de cada año. Los pagos se podrán hacer personalmente o por correo con cheque o giros a la orden de Fundación Revista Medicina.

Impreso en ZLOTOPIORO S.A.C.I.F., Sarmiento 3149 - Bs. Aires, Argentina

CUANDO LE SOLICITEN UNA PRUEBA ASO ASEGURE EL DIAGNOSTICO CON STREPTOZYME®

Mientras que los ensayos convencionales detectan solo ASO, STREPTOZYME detecta además de ASO otros anticuerpos* a exoenzimas indicadores de una infección a estreptococos.

STREPTOZYME permite detectar a más pacientes con anticuerpos a estreptococos, que efectuando las determinaciones con las pruebas ASO solamente. Vale el ejemplo de un estudio en el cual de 76 pacientes con infección estreptocócica confirmada, STREPTOZYME detectó el 95% mientras que con ASO solo el 60%. [1]

En presencia de un cuadro clínico compatible, una prueba STREPTOZYME, positiva, ayuda a confirmar el diagnóstico de fiebre reumática o glomerulonefritis aguda post-estreptocócicas. Debido a que STREPTOZYME detecta múltiples anticuerpos a exoenzimas incluyendo a ASO, *LOS TITULOS SE EXPRESAN EN UNIDADES STZ Y NO EN UNIDADES TODD.*

PARA BUSQUEDA

STREPTOZYME es ideal debido a que detecta a más pacientes en riesgo y a menudo anticipadamente en el curso de la enfermedad que utilizando solamente pruebas ASO. [2]

PARA CELERIDAD Y CONVENIENCIA

Mientras que las pruebas convencionales ASO se realizan en aproximadamente 2 horas, STREPTOZYME es una prueba en placa, simple en su realización, con facilidad en la visualización del punto final, en exactamente **2 minutos.**

PARA TITULACION

La simplicidad de la prueba STREPTOZYME facilita la tarea de titulaciones seriadas.

* AH, ASK, ADNasa, ANADasa. (anti: hialuronidasa, estreptoquinasa, desoxirribonucleasa, nicotinamida adenina dinucleotidasa).

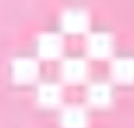
Referencias:

(1) Bisno AL, Ofek I: Am. J. Dis. Child 127:681 - (Mayo) 1974.

(2) Bergner - Rabinowitz S, Fleiderman S, Ferne M. y col.: Clin. Pediatr. 14:804-809, (Sept.) 1975.

Para información dirigirse a:

Gador
DIVISION DIAGNOSTICOS



Laboratorios Dr. Gador y Cía. S.A.C.I.
Florida 868 - 1005 Buenos Aires
T.E.: 32-6333/5 y 32-8481/5

INTER-A 11

Inmunoterapia antiviral, etiológica y sintomática

(IGA 11S + Interferón)

- Inter A 11 provee al organismo los elementos fisiológicos para eliminar la infección viral productora de herpes simple, herpes simple recidivante, herpes zóster e infección varicelosa.
- Su contenido en IgA 11 asegura la eliminación del vírus en el medio extra-celular.
- El Interferón elimina el vírus del acantonamiento intra-celular pues a través de su mecanismo de acción impide su replicación intra-celular.

INTER A 11
Colirio

Fórmula:
Contenido 3 ml.
Cada frasco de liofilizado contiene:

IgA 11S	0,0045 g.
Interferón	90.000 Unidades

Indicaciones:
Queratitis herpética y sus recurrencias. Afecciones oculares de etiología virósica, bacteriana o mixta.

Posología:
Durante la fase aguda instilar 1 gota en cada ojo cada hora, no menos de 12 veces en las 24 hs. Luego 1 gota en cada ojo 4 a 6 veces en el día hasta la remisión de la afección.

Contraindicaciones:
No tiene.

Efectos colaterales:
No posee.

Advertencias:
Una vez efectuada la solución mantener en la heladera (a 4° C).

Presentación:
Frasco con liofilizado y frasco gotero con 3 ml. de solvente.

INTER A 11
Ungüento

Cada 100 gr. de ungüento contienen:

IgA 11S	0,100 gr.
Interferón	3.000.000 Unidades

Indicaciones:
Herpes simple inicial, herpes simple recidivante.
Herpes zóster y lesiones varicelosas.

Posología:
Aplicar la pomada sobre la lesión herpética 4 a 6 veces al dia.

Contraindicaciones:
No tiene.

Efectos colaterales:
No posee.

Precauciones:
No debe administrarse en lesiones oftálmicas.

Presentación:
Pomos de 5 gr.

ISSN 0025-7680

MEDICINA

BUENOS AIRES

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

ARTICULOS ORIGINALES

REUNION ANATOMOCLINICA

ADELANTOS EN MEDICINA

EDITORIALES

CARTAS AL COMITE DE REDACCION

— — — —

★ en inglés.

VOL. 41, Nº 4 1981

MEDICINA

BUENOS AIRES

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

ORIGINAL ARTICLES

CLINICOPATHOLOGICAL CONFERENCE

ADVANCES IN MEDICINE

EDITORIALS

LETTERS TO THE EDITOR

— — — —

★ in English.

Para prevenir y resolver positivamente las hepatopatías

CIRRAMINA®

[(+) - cyanidanol - 3]

NUEVO PROTECTOR ESTRUCTURAL, ANTITOXICO Y RESTAURADOR FUNCIONAL HEPATICO

- **Mejora los potenciales energéticos y óxido-reductores hepáticos.**
- **Posee una doble propiedad antitóxica.**
- **Preserva la estructura hepática normal ante los variados tipos de agresión hística.**
- **Reinstaura el buen funcionamiento del hepatocito.**
- **Revierte rápidamente los procesos patológicos instalados en la glándula hepática.**
- **Es efectividad comprobada y óptima tolerancia en hepatoterapia.**

FORMULA. Cada comprimido laqueado ranurado contiene: (+)-Cyanidanol-3 monohidrato 0,500 g; Polivinilpirrolidona 0,010 g; Lauril sulfato de sodio 0,003 g; Estearato de magnesio 0,010 g; Eudragit E-100 0,006 g; Talco 0,0095 g; Dióxido de titanio 0,0065 g; Polietilenglicol 6000 0,00494 g; Rojo Punzó 4 R 0,00006 g.

ACCION TERAPEUTICA. Hepatoprotector

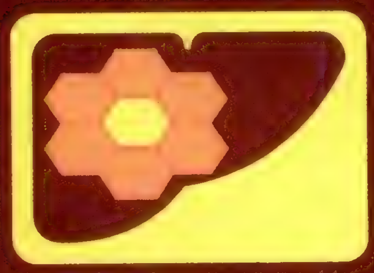
POSOLOGIA Y FORMA DE ADMINISTRACION. Adultos: 1 comprimido, 3 veces por día. Niños mayores de 6 años: 1/2 comprimido, 3 veces por día. Esta posología puede ser modificada de acuerdo a criterio médico y severidad del caso. Es de buena práctica administrar CIRRAMINA acompañando a las principales comidas.

ACCIONES COLATERALES Y SECUNDARIAS. En algunos pacientes pueden aparecer ligeras manifestaciones de intolerancia gástrica, que cesan readecuando la dosificación.

ANTAGONISMOS Y ANTIDOTISMOS. No presenta.

PRECAUCIONES, ADVERTENCIAS Y CONTRAINDICACIONES. En dosis terapéuticas, CIRRAMINA tiene perfecta tolerancia aún durante tratamientos prolongados.

PRESENTACION. Envase con 20 comprimidos laqueados ranurados.



Labinca

esfuerzo argentino para una salud mejor

Precio con IVA al público al 23/7/81
CIRRAMINA x 20 comp. $ 55. 845

TRIFACLOX

Ampicilina+dicloxacilina

LA TERAPIA BIBACTERICIDA
DE AMPLIA COBERTURA ANTIBIOTICA

Investigación y Tecnología Argentina

activa la digestión lenta

Los más altos índices de eficacia en trastornos digestivos de origen funcional u orgánico:

Distensión abdominal, sensación de plenitud, dolor epigástrico, eructos/aerofagia, pirosis/acidez, regurgitación, náuseas/vómitos mejoran significativamente con Motilium.

Libre de reacciones adversas:

Por disociación de acciones central y gastrocinética, Motilium está libre de cualquier efecto neurológico central. Muy bien tolerado, inclusive mejora la tolerancia a otras medicaciones.

Dosificación:

Síntomas de dispepsia: Un comprimido o 30 gotas (1 ml) 3 veces por día, 15 a 30 minutos antes de las comidas.

Dispepsia asociada con náuseas y/o vómitos: Dos comprimidos o 60 gotas (2 ml) 3 a 4 veces por día.

MARCA DE FABRICA

Motilium
JANSSEN

gastrocinético

información para la prescripción

Definición: La sustancia activa de Motilium es Domperidone (R 33812), una síntesis original de los Laboratorios de Investigación de Janssen Pharmaceutica de Bélgica.

Propiedades: Motilium normaliza la motilidad y el vaciamiento gástrico, careciendo de efectos colaterales, neurológicos o psicotrópicos.

Indicaciones: Trastornos relacionados con una evacuación gástrica deficiente, tales como: distensión abdominal, sensación de plenitud después de las comidas, incapacidad para terminar una comida normal, dolor epigástrico, aerofagia/eructos, pirosis/acidez, regurgitación, náuseas/vómitos y patología funcional pediátrica.

Posología y administración:

Dispepsia

Adultos: Un comprimido o 30 gotas (1ml) 3 veces por día, 15 a 30 minutos antes de las comidas.

Niños: Una gota (0,3 mg) por kilo de peso 3 veces por día, 15 a 30 minutos antes de las comidas.

Dispepsia asociada con náuseas y/o vómitos

Adultos: Dos comprimidos o 60 gotas (2 ml), 3 a 4 veces por día.

Niños: Una gota (0,3 mg) por kilogramo de peso 3 a 4 veces por día.

Ante intolerancia oral o cuadro agudo:
0,1 mg/kilogramo de peso, por vía intramuscular o intravenosa de 1 a 6 veces por día.

Observaciones: Se aconseja diluir las gotas en algún líquido mezclando bien antes de la administración.

Contraindicaciones: La ausencia de efectos colaterales neurológicos con Motilium es debido al hecho de la casi nula penetración de la droga en la barrera hematoencefálica.
Sin embargo, dado que en los primeros meses de vida las funciones metabólicas y las funciones de la barrera hematoencefálica no están totalmente desarrolladas, la aparición de efectos neurológicos no puede estar totalmente excluida en niños menores de 1 año, por lo que no se aconseja su uso en dicho grupo etario.
A pesar de no haberse observado efectos teratogénicos o embriotóxicos en estudios con animales, se contraindica el uso de Motilium en mujeres embarazadas.

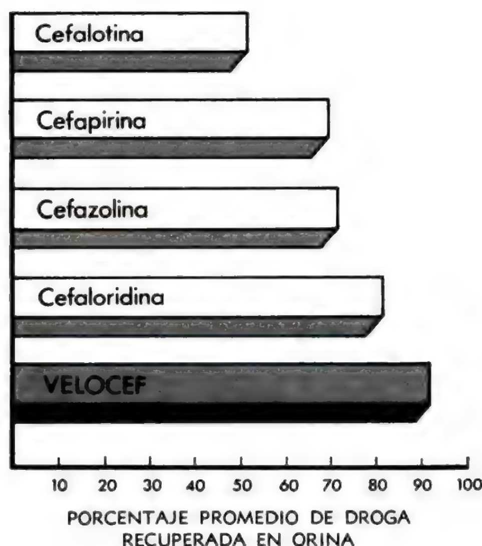
Presentaciones:
Comprimidos: Estuches conteniendo 20 y 40 comprimidos con 10 mg de Domperidone cada uno.
Gotas al 1%: Frasco gotero conteniendo 20 ml con 10 mg de Domperidone/ml (0,3 mg por gota).
Ampollas: Estuche conteniendo 5 ampollas de 2 ml (5 mg de Domperidone/ml).

Producido bajo licencia de
JANSSEN PHARMACEUTICA n v
Beerse, Bélgica

Elaborado por
Johnson & Johnson
de Argentina S.A. Comercial e Industrial
Darwin 471 - Buenos Aires

Precio al Publico al 1-6-81
Comprimidos x 20 $ 36.443.-; comp. x 40 $ 69.959.-
Solucion x 20 cc. $ 34.140.-; iny. de 2 ml. x 5 amp. $ 47.920.-

Concentración activa: Cefradina pasa al tracto urinario inferior sin metabolizarse, siendo activa contra los agentes patógenos aun en la vejiga.



VELOCEF posee el mayor grado de recuperación y la menor unión proteica.

Penetración efectiva: La curación o mejoría de los pacientes es, finalmente, el parámetro definitorio.

Porcentaje de pacientes curados o mejorados

	Nº PACIENTES	ORAL	Nº PACIENTES	INY.
Cistitis aguda	775	97 %	58	98 %
Cistitis crónica	182	92 %	19	95 %
Pielonefritis aguda	276	94 %	145	96 %
Pielonefritis crónica	118	88 %	39	92 %
Bacteriuria asintomática	23	91 %	3	100 %
Prostatitis	17	94 %	2	100 %
Uretritis no gonocóccica	9	89 %	1	100 %
Orquiepididimitis	7	100 %	—	—
Infecc. inespecíficas del tracto urinario	517	92 %	54	93 %

VELOCEF
(cefradina)
El factor decisivo

PRECIO PUBLICO CON I.V.A. AL 12-5-81
CAP.: 250 mg x 8 $ 24.248.—, 250 mg x 16 $ 44.582.—, 500 mg x 8 $ 43.490.— y 500 mg x 16 $ 79.482.—; COMP.: 1 g x 8 $ 79.482.—; INY.: 250 mg $ 12.268.—, 500 mg $ 23.327.— y 1000 mg $ 40.849.—; SUSP.: 250 mg x 60 ml $ 36.592.— y 250 mg x 120 ml $ 66.882.—.

SQUIBB

nuevo

ntibiótico de máxima potencia

cla

claforan

nuevo antibiótico de máxima potencia

COMPOSICION: CLAFORAN es Cefotaxime sódico (250 mg; 500 mg; 1 g; 2 g una nueva molécula antibiótica con el más amplio espectro bactericida frente gérmenes gram positivos, gram negativos y anaerobios.

PROPIEDADES: CLAFORAN ha demostrado su actividad mediante prueb in vitro frente a los gérmenes: estafilococos, estreptococos (el Streptococc faecalis es poco sensible), Streptococcus pneumoniae, Escherichia Coli, Citro bacter, Klebsiellas, Enterobacter sp., Serratia, Proteus (indol positivos e ind negativos), Providencia sp., Haemophilus influenzae, Neisseria. Menos se sibles: Pseudomonas aeruginosa y Bacteroides fragilis.

INDICACIONES: CLAFORAN está indicado en aquellas infecciones simples mixtas producidas por cepas sensibles de los gérmenes anteriormente citado tales como infecciones de las vías respiratorias, infecciones urinarias, seps endocarditis, meningitis, infecciones óseas, de las articulaciones, tejidos bla dos y de la piel, infecciones de la cavidad abdominal (peritonitis, infecciones las vías biliares y del tracto gastrointestinal), infecciones otorrinolaringológica quemaduras o heridas infectadas, infecciones de los órganos genitales, infe ciones en ginecología y obstetricia.

POSOLOGIA Y MODO DE EMPLEO

- Vía intramuscular (CLAFORAN 1000 - CLAFORAN 500 y 250)
  Disolver el CLAFORAN en su ampolla de solvente e inyectar profundamente en la región glútea.
- Vía intravenosa (CLAFORAN 2000; CLAFORAN 1000; CLAFORAN 500 y 250)
  Disolver el CLAFORAN en su ampolla de solvente y despues:
  - ya sea inyectar la solución por vía endovenosa directa, lentamente en la vena o en la tubuladura de la perfusión.
  - o utilizar la solución en perfusión continua o discontinua de una duración de 20 a 60 minutos.

La posología, la vía de administración y el ritmo de las inyecciones se eligen en función de la naturaleza y de la severidad de la infección, del estado del enfermo, así como de la sensibilidad de los gérmenes al cefotaxime.

En el adulto:

- La posología usual es de 2 g por día, en 2 inyecciones de 1 g.
- En los casos más severos, esta dosis se aumentará a 3 ó 4 g por día en 2 a 4 inyecciones.
- En los casos sumamente severos, la dosis podrá alcanzar por vía venosa, 12 g por día.

En el niño y en el lactante:

- La dosis cotidiana habitual es de 50 a 150 mg/kg, repartida en 2 a 4 inyecciones.
- Excepcionalmente, la posología diaria puede alcanzar 200 mg/kg.
- La administración en el prematuro está en curso de estudio.

Hasta que se establezca la posología, se recomienda no sobrepasar la dosis de 50 mg/kg/día, en razón de la inmadurez renal.

En el insuficiente renal:

La posología se ajustará modificando, ya sea la dosis unitaria, ya sea el ritmo de las inyecciones, teniendo en cuenta los niveles séricos del antibiótico, la depuración de la creatinina o la creatinina sérica. En pacientes con clearance de creatinina menor de 20 ml/min. la dosis total diaria de Claforan debe disminuirse a la mitad.

PRECAUCIONES DE EMPLEO

- Interrumpir el tratamiento en caso de reacción alérgica.
- Adaptar la posología en caso de insuficiencia renal orgánica o funcional.
- La asociación de medicamentos potencialmente nefrotóxicos y de diuréticos poderosos deberá tener en cuenta los riesgos debidos a estos medicamentos.
- En mujeres embarazadas.

EFECTOS INDESEABLES

- Reacciones locales: se han señalado flebitis después de inyecciones endovenosas dolor en el punto de inyección en las inyecciones intramusculares.
- Reacciones generales: se han observado casos de erupcion cutánea, de fiebre, eosinofilia, de diarrea, de leucopenia transitoria, de elevación pasajera de transaminasas TGO y TGP y de las fosfatasas alcalinas.
- La asociación con aminoglucósidos como así también con polimixina B y colisti aumenta la nefrotoxicidad de los mismos.

INTERACCION CON LAS PRUEBAS BIOLOGICAS

Se puede obtener una reacción falsamente positiva cuando se investiga la glucosa en orina con sustancias reductoras, pero ello no ocurre cuando se utilizan los méto específicos con la glucosa-oxidasa.

Puede producir alteración de las pruebas de Coombs.

ADVERTENCIAS Y RECOMENDACIONES

- En los sujetos hipersensibles a la penicilina, la utilización del CLAFORAN debe ser pruden siendo necesaria una vigilancia médica estricta desde la primera inyección.
- En la mujer embarazada, la seguridad de empleo no ha sido establecida, a pesar de que en experimentación animal no se ha puesto en evidencia efecto teratogénico.
- No se debe mezclar el CLAFORAN con ningún otro antibiótico en la misma jeringa o la mis perfusión.
- Utilizar la preparación extemporánea. La estabilidad de una solución de cefotaxime en soluciones de perfusión (isotónica de Cl Na, glucosa al 5%, solución de Ringer) es satisfacto durante 24 horas en la heladera y 12 horas a temperatura no mayor de 23°C.
- Conservar los frascos de CLAFORAN al abrigo de la luz y el calor.

CONTRAINDICACIONES

Está contraindicado en los sujetos alérgicos a las cefalosporinas. Puede existir alergia cruzada la penicilina.

EFECTOS TOXICOS, ANTAGONISMOS, ANTIDOTISMOS

No se conocen.

ROUSSEL

Avellaneda 2202 - (1636) OLIVOS (B.A.) - 791-8011/16 y 9041

α La ventaja Alfa

para toda clase de hipertensos

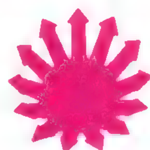
precios al 17-7-81

np. x 5	$ 29.182
np. x 20	$ 25.462
np. x 50	$ 60.880

Catapresan®

Clonidina

nuevo de Hoechst



PRETOR®

(Cefotaxima)

ARMONIA UNICA ENTRE AMPLITUD DE ESPECTRO, ACTIVIDAD Y TOLERANCIA

- El antibiótico de más amplio espectro.
- Estable frente a las β lactamasas bacterianas.
- Altas concentraciones en los sitios de infección.
- Eficacia y rapidez de acción.
- No altera la función renal.
- Antibiótico de elección, aún cuando los gérmenes no han sido identificados.
- Optima tolerancia en todas las edades.

PRETOR®

NO LE DA UNA SEGUNDA CHANCE A LA INFECCION

PRESENTACIONES

250 Mg 1 Fco. Amp. con 1 Amp. dil. precio 3/81: $ 18.909:
500 Mg " " " " " " " " " " ": $36.358:
1 g " " " " " " " " " " ": $69.919:
2g " " " " " " " " " " ": $127.724:

 ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 401-406 (1981)

MANIFESTACIONES REUMATICAS EN 50 CASOS DE HEPATITIS CRONICA ACTIVA

R. BISTUE, CLARA SMUCKLER DE CARENA, C. D. SCOGNAMILLO, L. MARTINEZ, MARIA PUEBLA DE PRIETO

Sección Reumatología, Cátedra de Clínica Médica II, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Hospital Central, Mendoza

La hepatitis crónica activa (HCA) es conocida por superponer algunos aspectos clínico-humorales con afecciones reumáticas, tales como: mialgias, artralgias, artritis, positividad de células LE, hipergammaglobulinemia, presencia de factor reumatoideo en sangre, así como una coexistencia mayor que la esperada por mera chance con queratoconjuntivitis sicca (QS) y otras manifestaciones del síndrome de Sjögren[5, 9, 13, 19]. Por esta circunstancia, es una de las afecciones reconocidas por llevar a un error diagnóstico, ya que por la presencia de estas manifestaciones puede simular una enfermedad reumática y postergar el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de base. Las manifestaciones músculo-esqueléticas de la HCA no han sido bien documentadas por los textos de medicina comunes, ni en revisiones clínicas, ni por textos de las especialidades de reumatología o hepatología; tampoco ha sido suficientemente establecida la prevalencia del rasgo QS y su proyección clínico-humoral dentro de la enfermedad primaria[1, 4, 11, 13, 15, 17]. La escasez de informes estructurados al respecto que es observada en la literatura, demuestra que las manifestaciones reumáticas de esta enfermedad, así como algunas asociaciones de interés reumatológico, no son en general demasiado conocidas o establecidas; igualmente su capacidad para simular otras afecciones reumáticas. Para contribuir a un mejor conocimiento y poder estructurar éstas en la HCA, nosotros efectuamos un estudio retro y prospectivo en 50 pacientes con esta afección, probada por biopsia y siguiendo los criterios de Sheila Sherlock[15].

Material y métodos

Todos los pacientes estuvieron internados durante un lapso no menor de 20 días, entre 1970 y 1980, en un Departamento de Medicina Interna. Fue fundamental la evaluación del paciente previa a todo tratamiento. Todas las biopsias hepáticas fueron examinadas por 2 patólogos, empleando iguales criterios.

El propósito fue caracterizar las manifestaciones músculo-esqueléticas, para establecer: frecuencia, patrón de afectación articular y/o muscular, evolución, anormalidades humorales y ampliar algunos aspectos vinculados a la presencia del antígeno de superficie y prevalencia de QS.

Todos los pacientes tuvieron biopsia hepática probatoria y se tabularon datos relativos a: artralgias, artritis, mialgias, deformación articular, radiología de las áreas articulares afectadas, fenómeno de Raynaud y el estudio para queratoconjuntivitis sicca, que requirió no solamente el test de Schirmer anormal, sino además alteraciones del humor preocular por examen con lámpara de hendidura a fin de detectar la presencia de grumos, película precorneana u otras alteraciones de la viscosidad y lesiones detectables por

— — — —

Recibido: 3-III-1981. Aceptado: 27-V-1981.

Dirección postal: Hospital Central, Alem y Salta, 5500 Mendoza, Argentina.

tinción con fluoresceína. El estudio ocular fue efectuado por un solo oftalmólogo. Se excluyeron los pacientes que previa o simultáneamente tuvieran diagnóstico de colagenopatía definida, alcoholismo o diabetes.

Los datos de laboratorio especialmente registrados fueron: proteinograma por electroforesis, considerándose hipergammaglobulinemia a valores superiores a 1.40 g %; factor reumatoideo (FR) en suero por el test del látex, considerándose positivos valores mayores a 1 : 160; células LE por el método de desfibrinación; nivel de complementemia por el método de Dacie, expresado en CH_{50} por ml (VN entre 70-150); factores antinucleares por inmunofluorescencia; anticuerpos anti-ácido desoxirribonucleico nativo por hemaglutinación pasiva; antígeno de la superficie del virus B de la hepatitis (HBsAg), por contrainmunoelectroforesis; fosfatasa alcalina (FAL), transaminasa glutámico oxalacética (GOT), transaminasa glutámico pirúvica (GPT), creatinfosfoquinasa (CPK), por técnicas espectrofotométricas; crioglobulinemia por precipitación.

El tratamiento estadístico fue realizado por la prueba del chi cuadrado y el test de Student.

Resultados

De los 50 pacientes, 31 (62 %) fueron mujeres. Las edades oscilaron entre 18 y 73 años. Treinta y cuatro pacientes (68 %) presentaron manifestaciones músculo - esqueléticas, las que fueron más frecuentes en mujeres (26 pacientes) presentándose en hombres solamente en 9 enfermos (Tabla 1).

TABLA 1. — *Manifestaciones músculo-esqueléticas en la hepatitis crónica activa*

Pacientes	n	Manifestaciones músculo - esqueléticas	
		Presentes	Ausentes
Total de pacientes	50	34 (68 %)	16 (32 %)
Hombres	19 (38 %)	9 (47.3 %)	10 (52.7 %)
Mujeres	31 (62 %)	26 (83.8 %)	5 (16.2 %)

Con respecto al momento de aparición de dichas manifestaciones, en relación a los signos clínico-humorales de la HCA, éstas precedieron a la enfermedad hepática en 11 pacientes, siendo simultáneas en 21, precoces (hasta 15 días antes) en un paciente y tardías (después de 30 días) en uno (Tabla 2).

TABLA 2. — *Aparición de las manifestaciones músculo-esqueléticas con respecto a las manifestaciones clínico-humorales de la hepatitis crónica activa*

Momento de aparición	Nº de pacientes
Precedieron	11 (32 %)
Simultáneas	21 (61 %)
Precoces (hasta 15 días)	1 (3.5 %)
Tardías (después de 30 días)	1 (3.5 %)

El tipo de manifestaciones reumáticas presentadas por los enfermos fueron: artralgias, 29 pacientes; artritis, 13 pacientes; mialgias, 20 enfermos; deformación articular, 7 pacientes, similar a la de una artritis reumatoide poco severa, sin erosiones radiológicas en todos los casos; dolor en columna vertebral, en 10 pacientes; rigidez matinal de manos de más de media hora de duración, 10 casos, y fenómeno de Raynaud en 5 pacientes (Tabla 3).

TABLA 3. — *Manifestaciones reumáticas en la hepatitis crónica activa*

Nº de pacientes	Manifestación
29 (58 %)	Artralgias
13 (26 %)	Artritis
20 (40 %)	Mialgias
7 (14 %)	Deformación articular
10 (20 %)	Dolor en columna vertebral
10 (20 %)	Rigidez matinal
5 (10 %)	Fenómeno de Raynaud

Con respecto a las articulaciones afectadas, para las artralgias las más comprometidas fueron: rodillas, en 22 pacientes; codos, 15 pacientes; muñecas, 15 pacientes; interfalángicas proximales, 15 pacientes, y tobillos, 3 pacientes. Para la artritis, las localizaciones fueron: rodillas, 11 pacientes; interfalángicas proximales, 10 pacientes; metacarpofalángicas, 7 enfermos; muñecas, 4 pacientes, y tobillos, 3 pacientes. (Tabla 4). Con respecto al número de articulaciones comprometidas, la afectación fue para las artralgias: poliarticular en 19 pacientes, oligoarticular en 8 y monoarticular en 2. Para las artritis, la prevalencia fue: poliarticular en 6 casos, oligoarticular en 5 y monoarticular en 2 pacientes (Tabla 5).

TABLA 4. — *Localización de las manifestaciones articulares en la hepatitis crónica activa*

Articulación afectada	Artralgias Nº de pacientes	Artritis Nº de pacientes
Hombros	12 (41 %)	1 (7.6 %)
Codos	15 (51 %)	2 (15.3 %)
Muñecas	15 (51 %)	4 (30.7 %)
Metacarpofalángicas	12 (41 %)	7 (53 %)
Interfalángicas proximales	15 (51 %)	10 (76 %)
Interfalángicas distales	1 (3.4 %)	— ——
Temporomaxilar	1 (3.4 %)	— ——
Coxofemorales	2 (6.8 %)	— ——
Rodillas	22 (75 %)	11 (84 %)
Tobillos	13 (44.8 %)	3 (23 %)
Columna cervical	4 (28 %)	— ——
Columna dorsal	2 (14 %)	— ——
Columna lumbosacra	8 (58 %)	— ——

La afectación fue para las artralgias: permanente en 12 enfermos, transitorias en 17, migratrices en 11 y simétricas en 18. La discriminación de iguales características para las artritis fue: 3 pacientes; 10 casos; 4 y 9, respectivamente (Tabla 6).

TABLA 5. — *Patrón de afectación articular en la hepatitis crónica activa*

Características	Artralgias	Artritis
Poliarticulares	19 (65.5 %)	6 (46.1 %)
Oligoarticulares	8 (27.5 %)	5 (38.4 %)
Monoarticulares	2 (7.0 %)	2 (15.5 %)
Total	29	13

TABLA 6. — *Patrón de afectación articular en la hepatitis crónica activa*

Características	Artralgias	Artritis
Permanentes	12 (41.4 %)	3 (23.1 %)
Transitorias	17 (58.6 %)	10 (76.9 %)
Migratrices	11 (37.9 %)	4 (30.8 %)
Simétricas	18 (62.1 %)	9 (69.2 %)

En 3 pacientes se obtuvo líquido sinovial de características moderadamente inflamatorias.

Las manifestaciones musculares consistieron en mialgias transitorias, sin repercusión funcional ni enzimológica.

En el grupo de pacientes con HCA, que además presentaban manifestaciones músculo - esqueléticas, destacaremos: presencia de HBsAg en 16 pacientes; células LE fueron positivas en 13 de 34 pacientes; hipocomplementemia se comprobó en 8 casos; hipergammaglobulinemia se constató en 29 pacientes; FR fue positivo en 20 de 37 pacientes; fenómeno de Raynaud, presentaron 5 pacientes; QS tuvieron 16 de 31 enfermos estudiados (Fig. 1).

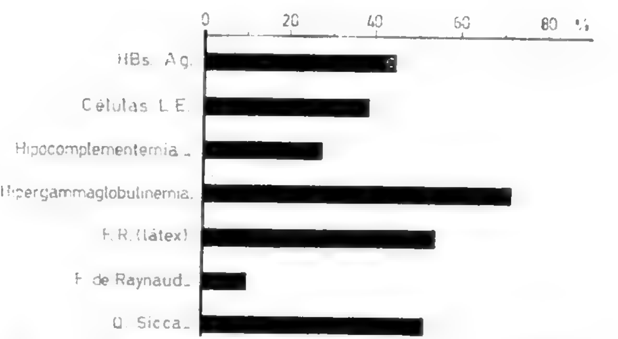


Fig. 1. — Aspectos crónica activa en la hepatitis

Dentro de los pacientes en los cuales se determinó el HBsAg, se establecieron 2 grupos. los HBsAg positivos, de los cuales tuvieron manifestaciones músculo-esqueléticas 13 y estuvieron ausentes en 3 y los HBsAg negativos, de los cuales 14 presentaron manifestaciones músculo-esqueléticas y en 5 estuvieron ausentes. El tratamiento estadístico demostró que no existían diferencias significativas en la presencia de dichas manifestaciones entre los 2 grupos (Tabla 7).

TABLA 7. — *Antígeno HBsAg y manifestaciones músculo-esqueléticas en la hepatitis crónica activa*

HBs Ag	Manifestaciones músculo-esqueléticas	
	Presentes	Ausentes
Positivo (16 pacientes)	13 (81.2 %)	3 (18.2 %)
Negativo (19 pacientes)	14 (73.6 %)	5 (26.4 %)

Probabilidad (p): No hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

En estos 2 conjuntos de pacientes se

TABLA 8. — *Antígeno HBs Ag y perfil inmunológico de las hepatitis crónicas activas estudiadas*

HBs Ag	Células L. E.			F. R. (látex)			Gammaglobulina		Complemento			
	+	—	No se hizo	+	—	No se hizo	N	↑	N	↑	↓	No se hizo
Positivo	1	14	1	4	11	1	1	15	9	—	2	5
Negativo	12	7	—	7	12	—	3	16	10	—	6	3
Significación estadística	$p < 0.0005$			p: no significativa			p: no sign.		p: no significativa			

establecieron, además, comparaciones respecto a presencia de células LE, positividad de FR, hipergammaglobulinemia e hipocomplementemia. La única diferencia estadísticamente significativa ($p <$ de 0.0005), es la que corresponde a la positividad de las células LE en los 2 grupos, en donde se observó una mayor prevalencia en los pacientes HBsAg negativos (Tabla 8).

Tabulando entidades asociadas de interés reumatológico, encontramos: 2 pacientes con colitis granulomatosa inespecífica, probada por biopsia; 2 casos de glomerulonefritis membranosa proliferativa, probados por biopsia y que no reunían criterios diagnósticos de la ARA para lupus eritematoso sistémico; 1 paciente con tiroiditis autoinmune, con anticuerpos antitiroglobulina positivos 1 : 250 000 y 1 paciente con una púrpura trombocitopénica idiopática.

Discusión

Una amplia gama de manifestaciones sistémicas ha sido descripta en la HCA y ellas han sido vinculadas a fenómenos inmunológicos. Aunque en algunas series la presencia de células LE ha mostrado buena correlación con las manifestaciones sistémicas, en estudios ulteriores no se ha observado tal eventualidad y de hecho la presencia de otros anticuerpos guarda también correlación muy precaria con las manifestaciones sistémicas [2, 3, 8, 9]. Igualmente, no se dispone de grandes series en las que se comparen estas manifestaciones, en casos HBsAg positivos y HBsAg negativos en la HCA [12, 16, 20]. No es fácil una valoración de la frecuencia de estas manifestaciones extrahepáticas, supuestamente autoinmunes, asociadas con la HCA, por los diferentes factores que han influído en la selección de los pacientes de los diferentes estudios previamente reportados. Así es como han existido datos no del todo claros respecto de las poliartralgias y poliartritis, aunque ellas hayan sido mencionadas [9, 10]. Otras manifestaciones que configuran el espectro sistémico de la afección pueden señalarse, tales como: eritema nudoso, erupción cutánea reportada como "vasculitis alérgica" por biopsia, así como otros tipos de lesiones cutáneas en el curso de la enfermedad [10, 11]. Es muy frecuente la presencia de diarrea precediendo muy a menudo a la enfermedad hepática. No son raras tampoco enfermedades renales, que suelen manifestarse dentro de un espectro que va desde la albuminuria leve hasta casos severos de glomérulonefritis y síndrome nefrótico; que en ocasiones han sido relacionados con el depósito en los glomérulos de complejos anticuerpo HBsAg. Después de una investigación minuciosa, puede descubrirse una acidosis tubular renal e igualmente la presencia de queratoconjuntivitis sicca (QS) y xerostomía, en una frecuencia que varía también grandemente según los diferentes autores, sin poderse señalar tampoco si algunos otros signos o síntomas del síndrome de Sjögren, presentes en la HCA son una consecuencia de la lesión hepática primaria [5, 13, 17, 19]. Otras de las manifestaciones extrahepáticas informadas son: pericarditis, pleuresía y otras enfermedades pulmonares, aunque su frecuencia parece depender del énfasis con que hayan sido buscadas, ya que a veces se

presentan en forma subclínica [13, 16]. Se han encontrado también, asociadas a la HCA: trombocitopenia, leucopenia, neutropenia y anemia hemolítica Coombs positiva. A veces, el mecanismo ha sido vinculado a una causa inmunológica, mientras que en otras se lo ha relacionado a la esplenomegalia [8, 10]. Con respecto a la presencia de enfermedades neurológicas, la frecuencia no ha sido reportada con la misma asiduidad con que se observan en la hepatitis viral aguda [20].

El papel del sistema inmune en la HCA, no está claramente definido. Cuando se describió por primera vez la HCA en mujeres jóvenes, en 1951 por Kunkel y asociados, se consideró a ésta como una enfermedad inflamatoria en la cual un ataque inmune sobre el hígado constituia el acontecimiento primario. El término "hepatitis lupoide" con que se designó a esta enfermedad, fue debido a la presencia de células LE [7, 9]. Ulteriores investigaciones, hasta ahora, han sugerido relaciones inmunes, como es la presencia de anticuerpos contra autoantígenos en muchos pacientes con HCA, al igual que en la cirrosis biliar primaria. Recientemente se ha señalado la posibilidad de que linfocitos sensibilizados específicamente, provoquen un ataque contra el hígado en la HCA [2, 6, 14, 18].

En nuestro estudio, las características clínico-humorales de las manifestaciones músculo-esqueléticas, particularmente la poliartritis simétrica, escasamente deformante y no erosiva radiológicamente, así como la elevada prevalencia de QS, recuerdan a las manifestaciones articulares que forman parte de enfermedades en las cuales hay fenómenos inmunológicos relevantes, por ejemplo: complejos inmunes circulantes. Estas manifestaciones, tanto desde el punto de vista clínico como humoral no dependen, al parecer, de la presencia de HBsAg, excepto para la positividad de las células LE, cuya mayor prevalencia se observó en los pacientes que no tenían el HBsAg.

Resumen

Se efectuó un estudio retro y prospectivo en 50 pacientes con hepatitis crónica activa (HCA), probada por biopsia. El propósito fue caracterizar las manifestaciones músculo-esqueléticas para establecer: frecuencia, patrón de compromiso articular y/o muscular, evolución y anormalidades humorales y observar algunos aspectos vinculados a la presencia del antígeno de la superficie del virus B de la hepatitis (HBsAg). Se encontró que las manifestaciones músculo-esqueléticas en la HCA, son frecuentes (68 %), pudiendo preceder al diagnóstico de la enfermedad de base. El patrón de compromiso articular fue: simétrico, poliarticular, no deformante y con evolución paralela a la actividad de la enfermedad hepática. No se apreciaron erosiones óseas radiológicas. En los casos en que se buscó queratoconjuntivitis sicca (QS), ésta apareció en un 51 %. Las manifestaciones musculares consistieron en mialgias transitorias, sin repercusión funcional ni enzimológica. Comparando los pacientes HBs Ag positivos y negativos, para las manifestaciones clínicas y humorales que nos propusimos investigar, la única diferencia estadísticamente significativa ($p <$ de 0.0005), fue la mayor prevalencia de positividad de células LE en los pacientes que tenían negativo el HBs Ag.

Summary

RHEUMATIC MANIFESTATIONS IN 50 CASES OF CHRONIC ACTIVE HEPATITIS.

The purpose of the present report is to give an account of the clinical and serological features of the rheumatic complaints found in chronic active hepatitis (CAH). A retrospective and prospective study group consisted of 50 patients with biopsy proven chronic active hepatitis (CAH), admitted in an Internal Medicine Department from January 1970 to June 1980. In 34 patients (68 %), musculoskeletal complaints were present (Table 1), arthralgias in 29, myalgias in 20, and arthritis in 13 patients. These patients presented genelalized back pain. Artralgias and arthritis were mainly symmetrical, polyarticular knees, proximal interphalangeal and metacarpophalangeal, ankles and wrists were the joints most frequently affected. The articular involvement was non defor-

ming and radiological studies of the affected joints showed no erosions. Raynaud's phenomenon was present in 5 patients (Table 3). Out 31 patients, 16 showed evidence of keratoconjunctivitis sicca (KS) (Fig 1). Hypergammaglobulinemia was observed in 29 patients. All the 50 patients had elevated sedimentation rate. Thirteen out of 34 patients had positive LE cells. Latex test for rheumatoid factor was positive in 20 out of 37 patients tested. Hypocomplementemia was seen in 8 cases. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) was determined in 35 patients being positive in 16 (45.7 %) (Fig. 1). When comparing the different clinical and serological rheumatic findings investigated, we found no statistically significant differences between the positive and negative HBsAg groups, except in that the negative group presented a higher prevalence of positive LE cells in serum (Tables 7, 8). The frequency of rheumatic complaints was similar in the two groups. Muscular symptons were always transitory myalgias, without a clear-cut pattern and normal levels of creatine phosphokinase (CPK) enzyme. Muscular weakness or atrophy was not seen. In general, muscle and joint symptoms correlated with the activity of the hepatic disease, being the initial clinical finding in some patients. It is concluded thet rheumatic complaints should be included among the frequent and occasionally extrahepatic manifestations of chronic active hepatitis.

Bibliografía

1. Alarcón Segovia D: Introducción a la reumatología. Editor: Donato Alarcón Segovia, México D. F., Cap 36, p 153, 1977.
2. Almeida JD, Waterson AP: Immune complexes in hepatitis. *Lancet* 2: 983, 1969.
3. Bearn AG, Kunkel HG, Slater RJ: The problem of chronic liver disease in young women. *Am J Med* 21: 3, 1956.
4. Decker JL: Arthritis and allied conditions. Hollander JL and Mc Carty DJ. Philadelphia, Lea and Febiger. Cap. 11, 1974.
5. Golding PL, Bown R, Mason AMS: Taylor E: Sicca complex in liver disease. *Brit Med J* 4: 340, 1970.
6. Klatskin G, Kantor FS: Mitochondrial antibody in primary biliary cirrhosis and other diseases. *Ann Int Med* 77: 533, 1972.
7. Kunkel HG, Ahrens EH, Eisenminger WJ, Bongiovanni AM, Slater RJ: Extreme hypergammaglobulinemia in young women with liver disease of unknown etiology. *J Clin Invest* 30: 654, 1951.
8. Mackay IR, Popper H: Immunopathogenesis of chronic hepatitis: A review. *Aust N Z Med* 1: 79, 1973.
9. Maclachlan MJ, Rodnan GP, Cooper WM, Fennell RH: Chronic Active ("lupoid") Hepatitis. A clinical, serological and pathological study of 20 patients. *Ann Int Med* 62: 425, 1965.
10. Mistilis SP, Blackburn CRB: Active Chronic Hepatitis. *Am J Med* 48: 484, 1070.
11. Moskowitz RW: Reumatología clínica. Salvat (edición española), Barcelona. Cap 10, p 153, 1977.
12. Pérez V, Gorodisch S: Progresos en hepatitis viral. *Medicina (Bs Aires)* 37: 54, 1977.
13. Redeker AG: Chronic Hepatitis. Symposium of diseases of the liver. *Med Clin N Amer* 59: 863, 1975.
14. Schumacher HR, Gail EP: Arthritis in acute hepatitis and chronic active hepatitis. Pathology of the synovial membrane with evidence for the presence of Australia antigen in synovial membranes. *Am J Med* 57: 655, 1974.
15. Sherlock S: Enfermedades del hígado y del sistema biliar. Editorial Beta (edición española). Buenos Aires, p 328, 1976.
16. Summerskill WHJ: Chronic hepatitis. *Am J Dig Dis* 20: 1087, 1975.
17. Thaler H: El hígado y sus enfermedades. Editorial Científico Médica (edición española). Barcelona, p 244, 1978.
18. Wands JR, Alpert E, Isselbacher KJ: The pathogenesis of arthritis associated with acute HBsAg positive hepatitis; complement activation and characterization of circulating immune complexes. *Gastroenterology* 67: 813, 1974.
19. Webb J, Whaley K, Mac Sween RNM, Nukig G, Carson W, Buchanan WW: Liver disease in rheumatoid arthritis and Sjögren Syndrome. Prospective study using biochemical and serological markers of hepatic dysfunction. *Ann Rheum Dis* 34: 70, 1975.
20. Wright R, Mc Collum RW, Klatskin G: Australia antigen in acute and chronic liver disease. *Lancet* 2: 117, 1969.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 407-418 (1981)

ALTERACIONES ELECTROCARDIOGRAFICAS EN ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (ONDA T CEREBRAL)

ESTUDIO CLINICO DE 20 CASOS

R. FOYE, MARINA VALLAZZA, A. LOCREILLE, J. VIDELA, M. A. CHIOZZA, L. D. SUAREZ, A. M. PEROSIO

Sección Cardiología y Sexta Cátedra de Medicina, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires

Es un hecho bien conocido que distintas afecciones del sistema nervioso central producen diferentes tipos de alteraciones electrocardiográficas, incluyendo arritmias, en ausencia de signos clínicos y hallazgos anatómicos de enfermedad cardíaca [13, 20, 37]. Entre esas afecciones sobresalen las hemorragias subaracnoideas por ser las primeras en las que se comprobaron [6] y por presentar una de las tasas de incidencia más elevadas de las mismas [12, 15]. Si bien son muy variados los cambios electrocardiográficos descriptos [13, 37], tiene particular interés la denominada onda T "cerebral" referida originalmente por Burch, Meyers y Abildskov [3], por constituir una patente distintiva que permite identificar con un alto margen de especificidad y sin necesidad de datos adicionales [24], el compromiso del sistema nervioso central, aunque no el grado del mismo [19]. A pesar de que se han comunicado numerosos hallazgos vinculados a estas últimas, es llamativo el porcentaje de interpretaciones incorrectas que es dable comprobar, en especial el falso diagnóstico positivo de isquemia o cardiopatía coronaria, con la consiguiente indicación de tratamientos innecesarios y no rara vez peligrosos para la afección original. Por otra parte, aunque resulta cada vez más amplia la lista de perturbaciones del sistema nervioso central en las que aparecen estos cambios característicos, no se ha insistido de manera suficiente sobre algunas circunstancias en las que, sin daño cerebral importante en el examen clínico, se producen con igual magnitud, frente a una disminución ligera o moderada del grado de lucidez o conciencia del paciente. El objetivo de este trabajo es, en primer lugar, relatar la experiencia sobre el tema recogida en un estudio retrospectivo-prospectivo efectuado en el Hospital de Clínicas. En segundo término, puntualizar diversos aspectos clínicos, en especial, circunstancias de aparición de la onda T "cerebral", sobre las que no existen referencias directas, a nuestro conocimiento, en la literatura. En tercer lugar, efectuar algunas consideraciones sobre la vinculación entre la onda T "cerebral", intervalo Q-T muy prolongado y arritmias cardíacas, sobre la base del monitoreo continuado y registros dinámicos Holter en los pacientes que integraron el grupo del estudio prospectivo. Por el contrario, no se consideran las alte-

Recibido: 19-I-1981. Aceptado: 19-V-1981.

Dirección postal: Sección Cardiología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Córdoba 2351, 1120 Buenos Aires, Argentina.

raciones electrocardiográficas de bajo índice de especificidad del electrocardiograma (ECG) en las afecciones cerebrales, ni el porcentaje de presentación tanto de éstas como de los cambios específicos, así como tampoco se analiza en detalle el mecanismo fisiopatológico en juego. Estos tres puntos son motivo de una investigación actualmente en curso, cuyos resultados serán dados a conocer en un trabajo posterior.

Material y métodos

De los estudios efectuados en el Laboratorio de Electrovectocardiografía de la Sección Cardiología desde enero de 1978 hasta julio de 1979, se seleccionaron cinco pacientes (casos 16 al 20), por presentar trazados con cambios electrocardiográficos que cumplían el criterio diagnóstico completo[24] (Fig. 1). Cabe señalar que en dicho laboratorio se realizan ECG convencionales bajo el efecto de diversas maniobras y drogas, así como vectocardiogramas (sistema Frank) en pacientes enviados desde el consultorio externo de la Sección, por presentar anormalidades electrocardiográficas que merecen un análisis detallado y a los que debe adjuntarse una historia clínica preformada, telerradiografía frontal de tórax y análisis complementarios de rutina. Además, en todos ellos, se llevan a cabo otros estudios incruentos (fonocardiograma, ECG dinámico, ecocardiograma y pruebas ergométricas graduadas).

Con posterioridad, desde agosto de 1979 hasta noviembre de 1980 se llevó a cabo un estudio prospectivo en la Sexta Cátedra de Medicina, para el cual se efectuaron ECG seriados a todos los pacientes con cuadro clínico de compromiso del sistema nervioso central, de causa vascular, infecciosa, tumoral, metabólica o tóxica. Fueron excluidos del estudio todos aquellos en los que no fue posible registrar al menos tres ECGs durante un lapso mínimo de 48 horas. En todos se obtuvieron trazados seriados cada 24-48 horas por 7 días, luego cada 3 a 5 días hasta la fecha del alta hospitalaria, y en muchos (Tabla 1) se efectuó electrocardiograma dinámico Holter (en nueve, registro continuo de 2 canales de 24-48 horas con grabador y analizador Avionics, y en tres con grabador programado tipo mini-Holter de un solo canal analizado en un osciloscopio Hewlett Packard modelo 4689 A). Con posterioridad, se registraron ECGs cada 15-21 días durante 3 meses en la Sección Cardiología. En todos los que mostraron ondas T "cerebrales" en trazados examinados al menos por tres observadores se efectuaron, además de las determinaciones de rutina (incluye un hepatograma habitual), dosaje de enzimas séricas (actividad total de creatinfosfoquinasa, transaminasas y dehidrogenasa láctica), de electrolitos seriados (cada 24-48 horas) de pH y gases en sangre arterial (según necesidad y con o sin administración de oxígeno por máscara a distintas concentraciones) con las técnicas convencionales.

Cuando se lo juzgó oportuno se realizaron punciones lumbares, arteriografía cerebral (inyección del medio de contraste por punción directa de ambas carótidas) y arteriografía coronaria (selectiva, técnica de Sones).

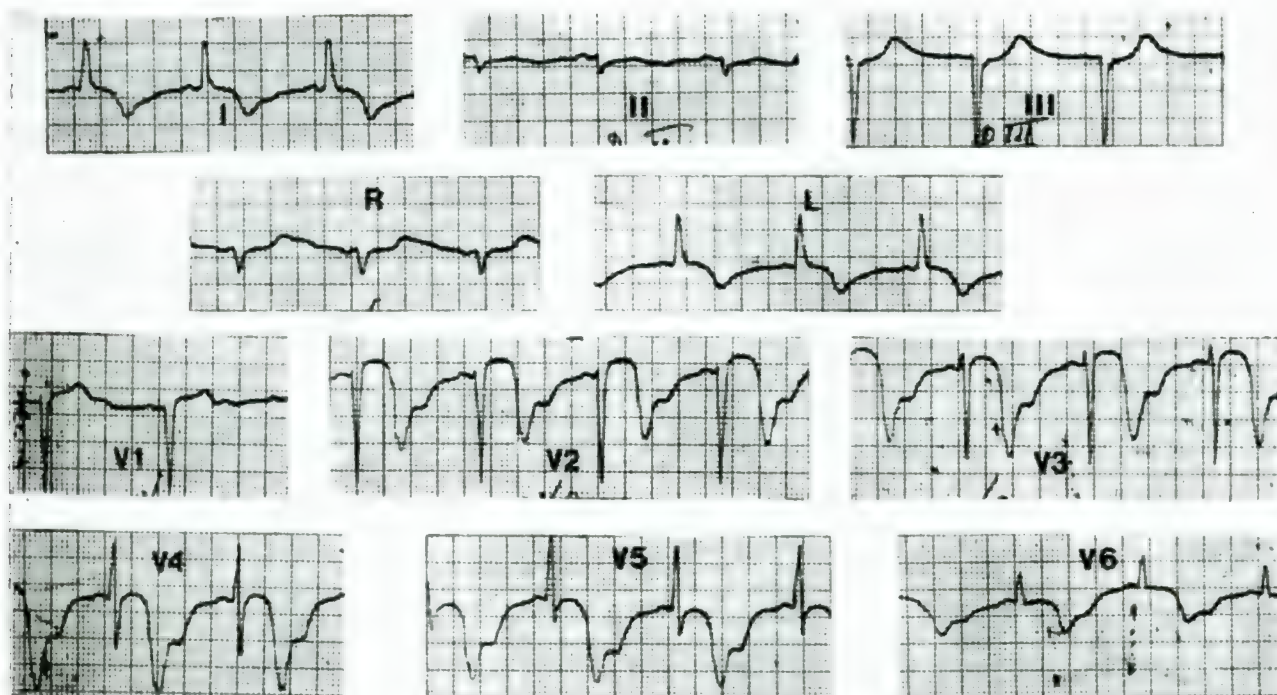


Fig. 1. — Electrocardiograma del caso 11. Obsérvese la fusión de las ondas T y U, así como la desaparición del intervalo isoeléctrico diastólico en la mayoría de las derivaciones a pesar de una frecuencia cardíaca normal.

En base a esta última se excluyó a un paciente de 51 años que reunía las condiciones previas pero presentaba una obstrucción significativa (mayor del 75 %) de la luz de los tres vasos coronarios. Por el contrario, se incluyó un paciente de 61 años (caso 11) con una obstrucción completa (100 %) de la coronaria derecha con infarto de cara diafragmática y obstrucciones no significativas (del 50 % al 75 %) de la descendente anterior por: *a*) poder precisarse la fecha en que ocurrió la necrosis (cuatro años antes); *b*) la falta de sintomatología de isquemia miocárdica reciente, y *c*) la ausencia de elevación enzimática al registrarse los cambios de la onda T. Tanto en este paciente como en una mujer de 82 años (caso 6) que sufrió un paro cardíaco en el curso de una encefalopatía hipertensiva y en una paciente de 25 años que presentó igual complicación durante una anestesia general por operación cesárea (caso 3) se llevaron a cabo centellogramas cardíacos con pirofosfato de Tecnecio 99 m 24-48 horas después de la aparición de ondas T "cerebrales", con resultado negativo (falta de captación). Quedaron incluidos así en este estudio prospectivo quince pacientes (casos 1 al 15).

Uno sólo de ellos recibió digital o drogas antiarrítmicas (propranolol) en el curso de la evolución o previa a ella (caso 15). Asimismo, uno de los cinco del estudio retrospectivo recibía betabloqueantes (propranolol) para el tratamiento de su hipertensión arterial (caso 16) antes de producirse el episodio sincopal que originó los cambios del ECG, pero fue suspendido al tercer día del mismo, a pesar de lo cual se produjeron dos nuevos episodios con similares cambios, entre el cuarto y séptimo día de la suspensión de la medicación.

Resultados

La edad, sexo, tipo de afección neurológica en juego, enfermedades concomitantes y principales características electrocardiográficas se han sintetizado en la Tabla 1.

Hallazgos clínicos

En ningún paciente fue dable comprobar hipotermia y en los que presentaron hipertermia sólo en un caso (caso 2) fue intensa (vecina a 41° C) pero en ninguno se modificó el ECG por ella, salvo por el agregado de taquicardia sinusal y extrasistolia supraventricular. En relación a la frecuencia cardíaca cabe consignar que exceptuando los pacientes con alto grado de bloqueo A-V (de segundo grado tipo Mobitz II y de tercer grado) en casi todos pudo registrarse durante la mayor parte de la evolución, una bradicardia absoluta (menor de 60 por minuto) o relativa (en relación a la hipertermia o a episodios de fibrilación auricular). En ausencia de signos sugestivos de enfermedad del nódulo sinusal (casos 15 y 16). el mayor grado de bradicardia sinusal fue observado en una paciente con meningoencefalitis aguda (caso 14).

No se encontró correlación alguna entre las cifras de presión arterial y la aparición o intensificación de las alteraciones electrocardiográficas. Si bien en una paciente existía un cuadro compatible con encefalopatía hipertensiva, las variaciones observadas en el ECG fueron independientes de las cifras tensionales registradas durante su evolución.

Dos pacientes con evidencias clínicas de enfermedad o disfunción sinusal presentaron onda T "cerebral" al recuperarse de cada episodio de síncope tipo Morgagni-Adams-Stokes. Ambos tomaban betabloqueantes (propranolol en dosis de 80-120 mg/día) para el tratamiento de una hipertensión arterial moderada v mientras en el primero (caso 16) se observaba su rápida desaparición (2-3 días), en el segundo (caso 15) persistían hasta tres semanas después del episodio sincopal. Este último presentaba, además, una diabetes de larga evolución, lo que hizo suponer una denervación simpática parcial a predominio del lado derecho. Luego de la inmediata supresión del propranolol se programó efectuar anestesia del ganglio estrellado izquierdo, pero no pudo llevarse a cabo. Las crisis sincopales persistieron a pesar de la supresión de los betabloqueantes y de la administración de vagolíticos (atropina endovenosa y bucal en dosis de 1 a 3 mg/día), por lo que debió recurrirse a la colocación de un marcapasos electrónico. Esto último también fue llevado a cabo en los pacientes que presentaron bloqueo A-V de alto grado (casos 17, 18 y 20), incluyendo el recambio del generador en otro similar (caso 19) por fallas en la estimulación endocárdica. En los cinco no volvieron a reproducirse los episodios sincopales ni las ondas T "cerebrales". Conviene decir que en tales pacientes pudo comprobarse la presencia de ondas T de gran voltaje y duración, por lo

TABLA 1. — *Principales características clínico-electrocardiográficas*

Caso	Edad y sexo	Diagnóstico clínico	Duración Q-T corregido (seg)	Onda T (—) Neg (++) Muy alta	Onda U	Desaparición cambios ECG	Evolución	Estudios efectuados
1	44 F	Hemorragia subaracnoidea. Aneurisma cerebral anterior.	0.52	(—) D2, D3, aVF, V2 a V5	Igual a T	10 días	Buena	Arteriografía Holter, LCR *
2	79 F	Hemorragia cerebromeníngea.	0.50	(++) D1, D2, aVF V2 a V5	Igual a T	—	Fallece 7º día	Arteriografía Holter, LCR
3	68 F	Hemorragia subaracnoidea.	0.60	(++) D2, D3, aVF V2 a V5	Igual a T	7 días	Buena	Holter, LCR
4	52 F	Hemorragia cerebromeníngea. Aneurisma comunicante anterior.	0.50	(—) D2, D3, aVF V1 a V5	No visible	—	Fallece 8º día	Arteriografía Holter, LCR
5	62 M	Hematoma intracerebral. Hipertensión arterial.	0.70	(++) D2, V1 a V6 Supradesnivel ST	No visible	2 meses	Operado Buena	Arteriografía Holter, LCR
6	82 F	Encefalopatía hipertensiva. Diabetes. Paro cardíaco.	0.60	(—) D1, D2, V1 a V6	No visible	10 días	Buena	Centellograma cardíaco. Holter
7	81 F	Isquemia cerebral transitoria (12 hs.). Hipert. arterial.	0.64	(—) D2, D3, aVF, V1 a V6	Igual a T	12 días	Buena	ECG seriados
8	85 F	Isquemia cerebral transitoria (3 hs.)	0.62	(—) D1, aVL, V1 a V6	Igual a T	8 días	Buena	ECG seriados
9	25 F	Cesárea (embarazo a término). Paro cardíaco anestésico.	0.70	(—) D1, D2, aVF V2 a V6	Igual a T	8 días	Buena	Centellograma cardíaco, Holter
10	61 F	Paro cardíaco anestésico. Mioma uterino.	0.68	(—) D1, D2, aVL, V2 a V5	No visible	3 días	Buena	ECG seriados. Holter
11	61 M	Hepatitis B. Diabetes. Cardiopatía coronaria.	0.64	(—) D1 aVL, V2 a V6	Igual a T	6 días	Buena	Centellograma cardíaco. Coronariografía
12	55 F	Crisis hipoglucémicas (coma). Tumor insular.	0.40	(++) V2 a V5	No visible	Variable 24-36 hs.	Fallece 30º día	ECG seriados
13	59 M	Diabetes descompensada. Neumopatía aguda.	0.46	(—) D1 aVL, V1 a V6	No visible	7 días	Buena	ECG seriados
14	12 F	Meningoencefalitis.	0.48	(++) D2, D3, aVF V1 a V6	No visible	15 días	Buena	LCR
15	76 F	Diabetes. Hipert. arterial. Beta bloqueantes. Disfunción sinusal. Síncope.	0.62	(—) D1, D2, V2 a V6	No visible	5 días	Buena	Holter. Marcap. transitorio, luego definitivo
16	80 M	Hipert. arter. Beta bloqueantes. Disfunción sinusal. Síncope.	0.64	(—) D1, D2, aVL, V2 a V6	Igual a T	2-3 días	Buena	Holter
17	79 F	Bloqueo A-V completo. Fibrilación auricular. Síncope.	0.78	(—) D1, D2, D3, V2 a V6	Igual a T en V2-V3	2 días	Buena	Marcapasos definitivo
18	62 M	Mobitz II 2 : 1. Síncope.	0.72	(++) D2, D3, aVF, V1 a V6	No visible	2 días	Buena	Holter. Marcapasos defin.
19	72 M	Bloqueo A-V completo. Falla marcapaso previo. Síncope.	0.60	(—) D1, D3, aVF, V2 a V5	Igual a T	3 días	Buena	Holter. Cambio de Marcapasos
20	83 F	Bloqueo A-V alto grado. Diabetes. Síncope.	0.64	(++) D1, D2, aVL, V2 a V6	No visible	2 días	Buena	Holter. Marcapasos definitivo

* LCR: Examen de líquido cefalorraquídeo.

general positivas, idénticas a las "cerebrales", (durante o después de equivalentes de episodios sincopales, tales como ligeros vahidos, "lagunas", sensación de "cabeza vacía" o "liviana", que también testimonian una caída del flujo sanguíneo del encéfalo. Tales ondas T, al igual que los prolongados intervalos Q-T, no estaban sólo vinculados a la baja frecuencia cardíaca, ya que se presentaban aún en ausencia de cambios significativos de ésta o en desproporción con la misma. En la paciente con episodios de hipoglucemia por presunto tumor insular pancreático los cambios del ECG aparecían sólo cuando se producía pérdida completa de la conciencia, revirtiendo en menos de 48 horas desde el momento de corrección de la glucemia. Debe recalcarse que tenores casi idénticos de esta última (entre 30 y 40 mg %) no se acompañaban de modificaciones sustanciales del ECG, si se corregía con prontitud la primera, evitando el desencadenamiento del coma hipoglucémico. En franco contraste con tales hallazgos, dos pacientes con diabetes del adulto de largo data desarrollaron típicas ondas T-U "cerebrales" con grados muy ligeros de obnubilación mental. En el primero (caso 11), la descompensación de la diabetes fue aparentemente ocasionada por una hepatitis B, sin que pudieran objetivarse signos clínicos o de laboratorio sugestivos de falla hepática grave (Fig. 1). En el segundo, la descompensación fue atribuida a una neumopatía aguda (bronquioalveolitis) a germen no identificado. En ambos la recuperación de la lucidez completa, 48 horas más tarde, fue seguida por la rápida normalización del trazado, debiendo puntualizarse que los niveles de potasio se mantuvieron normales durante todo el episodio, al igual que el tenor de bicarbonato y de actividad sérica total de TGO, CPK y LDH. Resulta necesario señalar que no se detectaron modificaciones de los hallazgos del examen físico del aparato cardiovascular cuando resultaron más intensos los cambios del ECG atribuibles al compromiso cerebral.

Hallazgos complementarios

En contraste con lo observado por algunos[15] y a pesar de la variedad de causas posibles de perturbar la viabilidad de las células cerebrales, no se constataron elevaciones enzimáticas por encima de los valores máximos normales, excepto en los casos 1 y 9. En ambos se produjo un aumento moderado (2 y 4 veces el rango máximo normal, respectivamente) de la actividad sérica total de CPK. En los dos existían, sin embargo, múltiples inyecciones intramusculares, disecciones venosas y en el último la mayor elevación coincidió con el segundo día del postoperatorio de una cesárea de feto a término.

No se constataron modificaciones significativas de los electrolitos sanguíneos y gases arteriales en la mayoría de los pacientes (14 de 20). En seis de ellos existían grados ligeros de hipopotasemia (entre 3 y 3.5 mEq/l) y de hipoxemia (p02 entre 70 y 80 mm Hg) pero su inmediata corrección no provocó cambios evidenciables en el ECG.

Dada la índole de la afección causal responsable de la pérdida parcial o total de la conciencia de los pacientes, sólo se efectuó punción lumbar en un número reducido de ellos (ver Tabla 1). Si bien se comprobaron cifras elevadas de presión del líquido cefalorraquídeo en todos menos en uno (caso 2), ellas resultaron apenas por encima de los valores máximos normales y la evacuación necesaria para el examen no modificó el curso ulterior de las alteraciones del ECG. No fue dosado el tenor de potasio en el mismo y el examen macro-microscópico evidenció los hallazgos propios de cada proceso, en especial el franco carácter hemorrágico de las hemorragias meníngeas puras o cerebromeníngeas. En cuatro pacientes de este grupo se llevó a cabo arteriografía cerebral, que mostró en dos casos un aneurisma (comunicante anterior y cerebral anterior, respectivamente) y en otro un hematoma intracerebral en fosa anterior. Uno de los primeros falleció a los siete días del comienzo del cuadro, mientras que el segundo no fue operado, presentando una evolución satisfactoria y manteniéndose asintomático en más de dos años de seguimiento. Por el contrario, el paciente con hematoma intracerebral fue intervenido con éxito, a pesar de lo cual presentó una persistencia de la onda T "cerebral"

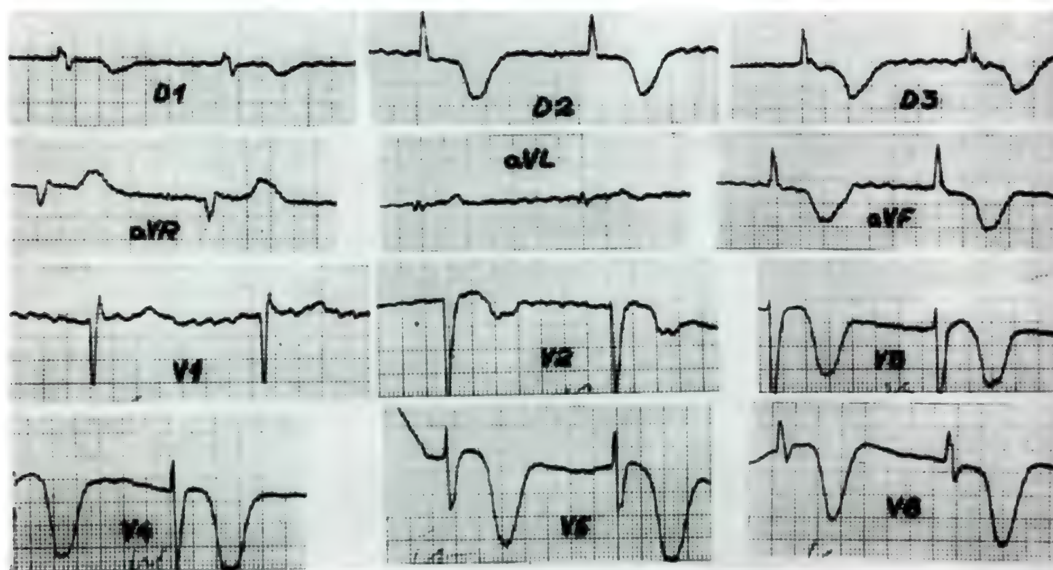


Fig. 2. — Electrocardiograma del caso 17. Fibrilación auricular, bloqueo A-V completo. Nótese la gran duración del intervalo Q-T y el aspecto "monstruoso" de las ondas T. Registrado poco después de un episodio de Morgagni-Adams-Stokes.

y un desnivel positivo del segmento S-T de V 1 a V 3 durante 2 meses.

Hallazgos electrocardiográficos

En relación al momento de aparición de los cambios del ECG, fueron: *a*) inmediatos en la crisis de Morgagni-Adams-Stokes; *b*) precoces (dentro de las primeras 24 horas) en las pérdidas de conciencia por hipoglucemia, paro cardíaco por anestesia general, y encefalopatía hipertensiva, así como en los dos pacientes diabéticos señalados, y *c*) retrasados (entre las 24 y 96 horas del comienzo del cuadro) en el resto de los enfermos, en especial en los que presentaron hemorragias intracraneales.

El intervalo Q-T corregido para la edad, sexo y frecuencia cardíaca (fórmula de Bazzet) se mostró prolongado en todos los enfermos. El de mayor duración fue de 0.78 seg.). Siempre se registraron ondas T de gran voltaje, algunas de ellas "monstruosas", representando sin lugar a dudas las de mayor magnitud de la electrocardiografía (Fig. 2). En trece enfermos se inscribieron invertidas en la mayoría de las derivaciones, en especial desde V 2 hasta V 6. El vértice resultó con frecuencia redondeado, pero en algunos casos se lo observó acuminado, recordando a ondas coronarias, pero asimétricas. En siete pacientes, por el contrario, las ondas T fueron positivas, por lo que dado su gran voltaje resultaron con frecuencia iguales o superiores a las ondas R, en varias derivaciones (Fig. 3), siendo un cociente T/R mayor de 1 un buen índice para identificar estas ondas "cerebrales" positivas [27]. De todas maneras siempre superaron el límite máximo normal en la mayoría de las derivaciones, estimado en 12 mm [24].

La duración fue difícil de medir en varios trazados, por ser evidente la fusión con ondas U de gran voltaje y polaridad concordante (Figs. 1 y 4). No rara vez se observó la desaparición del intervalo diastólico/isoeléctrico, al ocupar la T "cerebral" todo el espacio entre la R y la P del ciclo siguiente. Al igual que en la descripción original de estas alteraciones [3], ello ocurrió con frecuencias cardíacas apenas por encima y aún por debajo de 100 por minuto (Fig. 2).

En siete pacientes se registraron vectocardiogramas, los que mostraron gran área de la onda T y lenta inscripción, pero manteniendo la asimetría, así como una más fácil identificación de la onda U, que presentó igual sentido de rotación que la

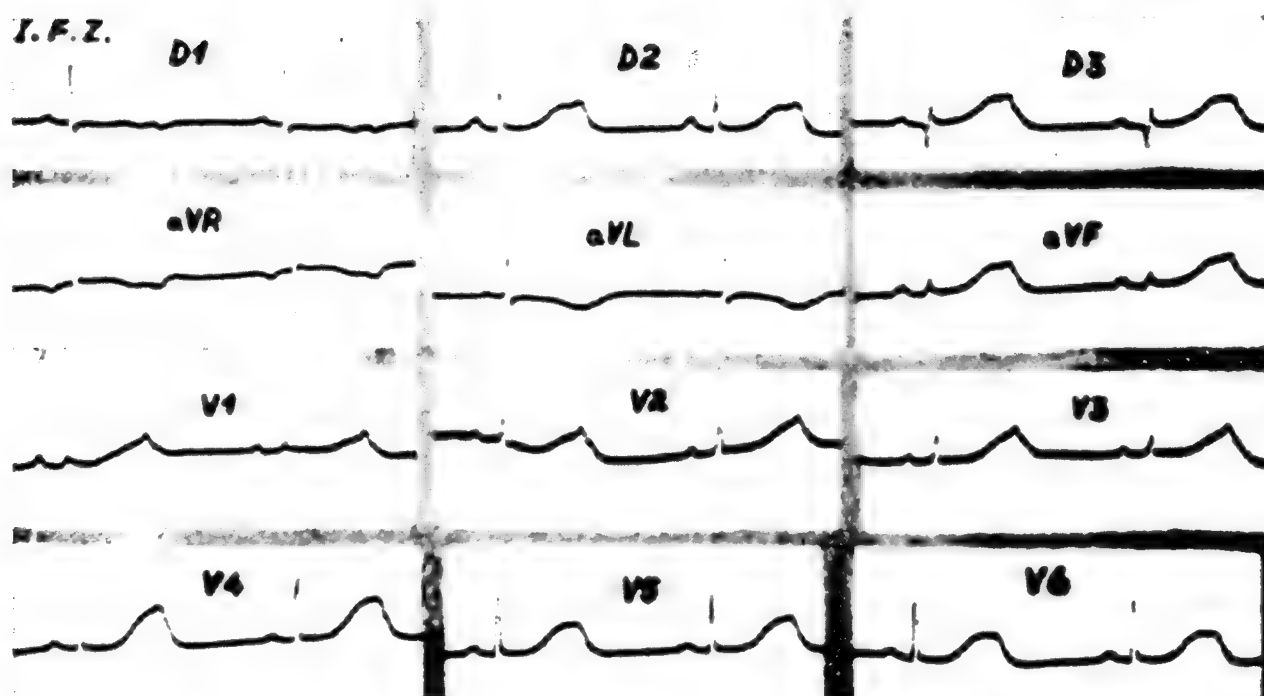


Fig. 3. — Electrocardiograma del caso 18. Bloqueo A-V Mobitz II 2 : 1. Las ondas T positivas superan en voltaje a las ondas R en varias derivaciones. Registrado poco después de un episodio de Morgagni-Adams-Stokes.

primera. La ubicación espacial de la onda T resultó variable, pero con predominio de la posterior-izquierda-superior.

En todos, excepto en el paciente con hematoma intracerebral (caso 5), la atenuación y desaparición de los cambios del ECG estuvieron estrechamente vinculados a la mejoría del cuadro neurológico, con una duración total que osciló entre 2 y 25 días.

Dos pacientes fallecieron sin que se registraran modificaciones adicionales en los trazados, salvo extrasistolia supraventricular, hasta pocas horas antes del deceso. Durante su monitoreo, sólo aparecieron extrasístoles ventriculares repetitivas y fibrilación ventricular cuando se produjeron sustanciales modificaciones hemodinámicas finales (presión arterial sistólica menor de 80 mm Hg) secundarias al daño cerebral.

En el resto de los enfermos del estudio prospectivo no aparecieron arritmias ventriculares graves (sólo extrasístoles ventriculares, monofocales esporádicas), ni se desarrolló un paro cardíaco inesperado, o una fibrilación ventricular primaria.

Por el contrario, se registraron con frecuencia extrasístoles supraventriculares (auriculares y de la unión A-V) aisladas, bigeminadas, periódicas y a veces múltiples.

En dos pacientes se produjeron sendos episodios de fibrilación auricular que no necesitaron medicación por la baja frecuencia ventricular. Ambas crisis cedieron en forma espontánea.

Discusión

Se han descripto numerosas alteraciones clínico-electrocardiográficas en el curso de diversas afecciones cerebrales, entre las que sobresalen arritmias, trastornos variados de la repolarización ventricular y bloqueos intraventriculares [37]. Buena parte de ellas son inespecíficas y pueden simular a la perfección, distintas formas de isquemia miocárdica. Por ello no debe extrañar que muchos pacientes sean enviados a unidades coronarias o de cuidados intensivos, con el diagnóstico de cardiopatía coronaria aguda, en especial infarto de miocardio [2, 25, 32]. Junto a los perjuicios de toda índole que surgen de una interpretación errónea, figura aquí el riesgo a veces considerable que corren pacientes con afecciones cerebrales de ser sometidos a un eventual tratamiento anticoagulante, o con drogas antiarrítmicas, que con frecuencia

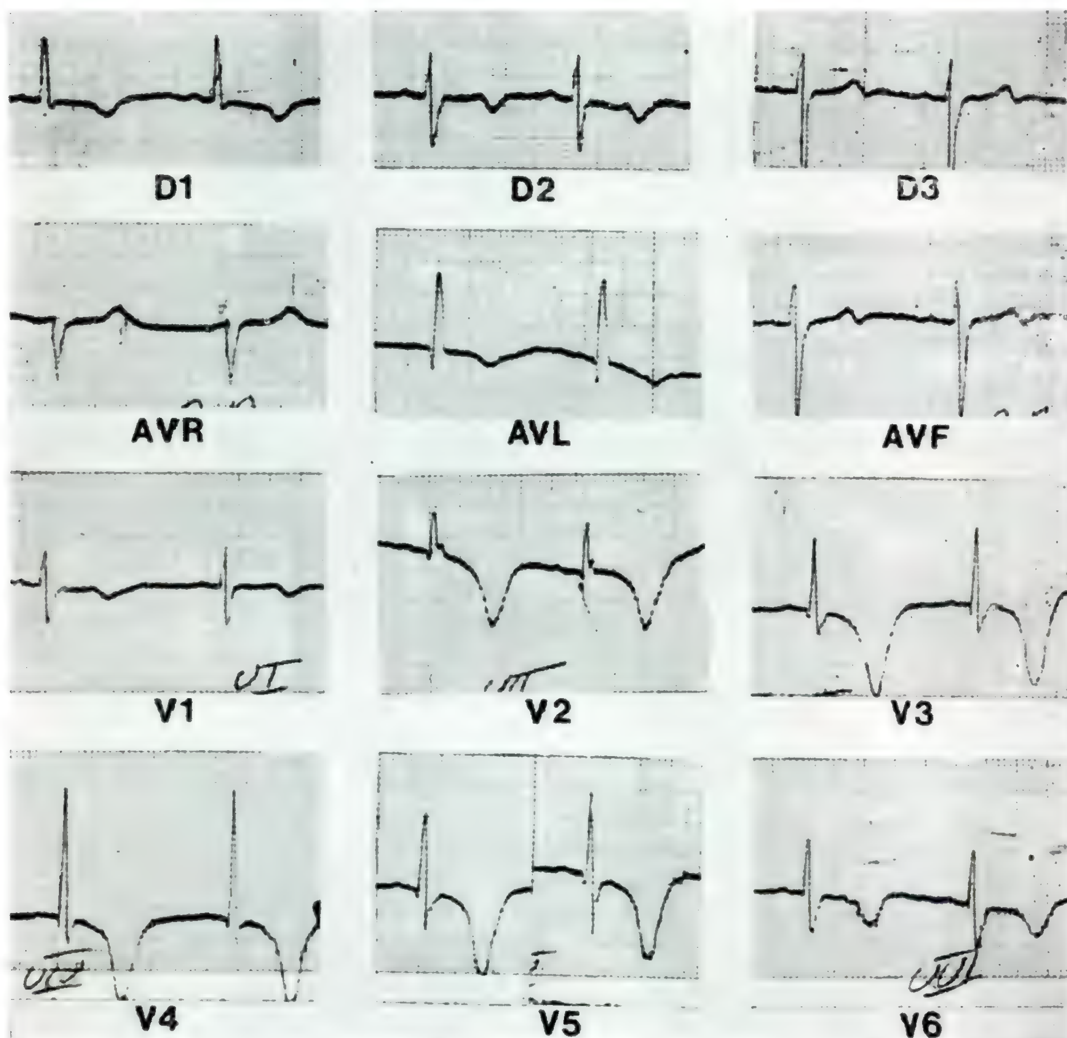


Fig. 4. — Electrocardiograma del caso 8 que muestra la dificultad de medir el intervalo Q-T en varias derivaciones por la presencia de ondas U.

son netamente depresoras del sistema nervioso central. Además, como lo señala Vilches [32], dada la posibilidad de utilizar corazones de pacientes con daño cerebral grave e irreversible para su trasplante a cardiópatas con insuficiencia cardíaca terminal, el desconocer los citados cambios, puede desalentar el procedimiento, por suponer una enfermedad cardíaca inexistente en el posible dador. Por fortuna, un porcentaje considerable de alteraciones del ECG dependiente de enfermedad cerebral son fácilmente identificables; ellas no parecen ser lo suficientemente conocidas como lo prueba el hecho que diez de nuestros pacientes fueron considerados inicialmente portadores de infarto de miocardio o de una isquemia-lesión aguda persistente y tratados en consecuencia. La ausencia de ondas Q patológicas, la gran magnitud de las ondas T, su presencia en casi todas las derivaciones y una exagerada prolongación del intervalo Q-T, suelen ser siempre elementos suficientes para efectuar la filiación correcta. Aunque se ha relatado un alto porcentaje de intervalos Q-T prolongados en el infarto agudo de miocardio y afecciones isquémicas relacionadas [11],

[29], el comprobar un valor mayor de 0.60 seg en ausencia de bradicardias extremas (sinusal o por bloqueo A-V), debe considerarse sospechoso de una afección metabólica o cerebral. Descartado lo primero por medio de dosajes plasmáticos convencionales y en ausencia de drogas depresoras de la conducción intraventricular, deben extremarse las medidas para detectar una posible perturbación del sistema nervioso central. Aunque en esta serie el dosaje de la actividad sérica total de las enzimas corrientes resultó un índice confiable para descartar una necrosis miocárdica, no todos han obtenido resultados similares [15]. Por el contrario, la alta especificidad demostrada por las isoenzimas, la mioglobina y el centellograma con pirofosfato de Tecnecio 99 m, suelen ser definitorias, tanto en ésta como en otras circunstancias [21]. Conviene recordar al respecto, que a pesar de haberse relatado hemorragias subendocárdicas y otras alteraciones miocárdicas en estudios clínicos [18] y experimentales [35] sobre el efecto de enfermedades agudas intracraneales en el aparato cardiovascular, ello no fue confirmado en otras investigaciones [8, 12, 15, 19, 34], o fue vinculado a condiciones muy especiales, como una inusual simpaticotonía por lesiones de determinadas áreas del encéfalo [37].

Aunque la investigación de la fisiopatología no es un objetivo básico de este trabajo, resulta ineludible recalcar que la mayor parte de los factores incriminados por los distintos autores como responsables de las modificaciones, tanto típicas como inespecíficas del ECG [8, 12, 13, 15, 19, 25, 37], no estuvieron presentes en los enfermos de esta serie. Así, en ninguno pudo comprobarse una alteración sustancial de los niveles de potasemia, pH, p02 y pC02 arterial, temperatura corporal, o presión del líquido cefalorraquídeo. Si bien esto no puede considerarse un argumento definitivo para excluirlas dado el número de observaciones, resulta al menos lo suficientemente significativo como para crear serias dudas sobre su verdadero papel. Más trascendente parece ser el hecho de haber comprobado una típica patente de ondas T-U "cerebrales" en pacientes con aparente escaso daño encefálico y por el solo hecho de presentar una moderada obnubilación creada por una diabetes descompensada, o un bajo flujo cerebral por disminución del volumen minuto cardíaco. Ello significa que no siempre es necesaria la presencia de lesiones orgánicas y de una pérdida completa de la conciencia, para que se produzcan. Estas comprobaciones, sobre las que no hemos podido encontrar referencias concretas en la literatura, inducen a pensar que el grado de lucidez o de conciencia, tiene tanta importancia como el daño directo de ciertas estructuras encefálicas, en la génesis de los cambios electrocardiográficos.

Es interesante mencionar al respecto, que se ha vinculado en forma estrecha, la prolongación del intervalo Q-T, incluso el de origen congénito y familiar, a una desarmonía en la inervación simpática del corazón [33]. Tanto la sobreestimulación del ganglio estrellado izquierdo, como el déficit de estimulación o la inhibición del ganglio estrellado derecho, no sólo tienden a aumentar la duración del intervalo Q-T, sino a modificar la morfología y aún la polaridad de la onda T [7, 28]. Incluso se ha relatado el desarrollo de una típica patente de onda T "cerebral", en sujetos sometidos a denervación simpática derecha [14]. Dado que un alto porcentaje de pacientes con diabetes de larga data presentan evidencias de denervación simpática, cabe la posibilidad de que el desarrollo de una típica onda T "cerebral" en tres pacientes diabéticos de esta serie (casos 11, 13 y 15), con grados menores de perturbación encefálica, obedecieran a un mecanismo semejante. Lamentablemente, por dificultades de orden técnico no pudo llevarse a cabo una confirmación de tal presunción, sobre la base de maniobras de estimulación o inhibición de los ganglios estelares. En franco contraste con estos hechos, debe puntualizarse que una paciente con episodios de grave hipoglucemia, sólo desarrollaba ondas T "cerebrales" típicas cuando alcanzaba un grado de inconciencia considerable (coma profundo) y que niveles semejantes del tenor glúcido de la sangre, pero sin producción del estado comatoso, no modificaban la repolarización ventricular en el ECG. Descartado un disturbio electrolítico concomitante en base a las determinaciones com-

probadas, surge nuevamente la idea de que el grado de lucidez o de conciencia, parece vincularse al desarrollo de la patente cerebral típica.

Otro hecho que merece comentario, es el tipo de arritmias comprobadas en los controles por monitoreos o registros dinámicos Holter. Excluidos los pacientes con bloqueo A-V y los dos casos con disfunción sinusal, sólo se registraron extrasístoles supraventriculares múltiples, ventriculares aisladas monofocales y dos episodios de fibrilación auricular. Esto concuerda con lo observado por Vilches en una serie numerosa de pacientes con accidentes cerebrovasculares agudos [32]. Dada la conocida acción de la estimulación colinérgica sobre el miocardio auricular [1, 31], resulta lógico admitir la presencia de una vagotonía de origen central, que según muchos sería un mecanismo frecuente en estas circunstancias para explicar la génesis de las arritmias supraventriculares. En contraste, no se detectaron, al igual que en la serie de Vilches, arritmias ventriculares significativas, hecho que se opone a lo referido por otros autores [16, 23, 25, 36], quienes atribuyen la aparición de este tipo grave de arritmias a una marcada liberación de catecolaminas, motivo por el que propugnan la administración de betabloqueantes, tanto para su tratamiento como para su prevención [9]. Por otra parte, dada la marcada prolongación del intervalo Q-T presentada por estos pacientes, lo lógico sería haber registrado una alta incidencia de arritmias ventriculares, incluyendo la llamada taquicardia a "torsión de puntas" y muerte súbita, tal como ocurre en otros cuadros con igual alteración electrocardiográfica, en especial, los de origen congénito [17], o los secundarios a la acción de diversas drogas [10, 26]. En realidad, esta afirmación sería válida, sólo si el intervalo Q-T expresara siempre la duración del período refractario de las fibras miocárdicas ventriculares. De esta manera, una prolongación del primero, traería aparejada la del segundo, y con ello la posibilidad de desarrollo de uno de los mecanismos básicos de las arritmias, es decir, los bloqueos unidireccionales con reentrada del estímulo. Sin embargo, sobre la base de la esencia misma del proceso de repolarización ventricular, caracterizada por áreas múltiples o más o menos simultáneas de recuperación del potencial de reposo [4, 5], se ha cuestionado que pueda establecerse una vinculación estrecha en todos los casos, entre la duración del intervalo Q-T y la refractariedad total o parcial de las fibras ventriculares [33]. Por lo tanto, la presencia de una exagerada duración del primero en los pacientes con afecciones encefálicas, no puede ser esgrimido a favor de una posible mayor frecuencia de arritmias ventriculares. En relación a la mencionada acción beneficiosa de los betabloqueantes en las primeras, como en otras formas del síndrome de Q-T largo, cabe señalar que ella no se basa en una reducción del mismo [22, 30]. En consecuencia, la exagerada prolongación del intervalo Q-T y la ausencia de arritmias ventriculares comprobadas en nuestra serie, no constituirían hallazgos contradictorios.

Resumen

Aunque existen referencias previas de cambios electrocardiográficos en el curso de accidentes cerebrovasculares agudos, es en 1954 cuando Burch y colaboradores describen una patente típica de afección del sistema nervioso central. A pesar de que a partir de entonces se efectuaron numerosas comunicaciones que reiteraron esos hallazgos y ampliaron la lista de afecciones cerebrales donde pueden hacerse presentes, resulta llamativa la aún frecuente interpretación errónea de estos cambios. Diez de los veinte pacientes que integran este estudio retrospectivo-prospectivo de la patente electrocardiográfica denominada onda T "cerebral", fueron tratados inicialmente como portadores de una cardiopatía coronaria aguda. Del análisis de las afecciones neurológicas causales de esta serie, surge que no es necesaria una enfermedad orgánica del encéfalo, con pérdida más o menos completa de la conciencia, para que se produzca dicha patente. Además, no pudo comprobarse la presencia de buena parte de las alteraciones que han sido incriminadas como responsables directas de las modificaciones

de la repolarización ventricular. Por el contrario, se encontraron algunas evidencias de participación del sistema nervioso simpático en la génesis, evaluándose la posible vinculación con el denominado síndrome de Q-T largo. Sin embargo, controles de monitoreo simple y electrocardiograma Holter en un grupo de pacientes, no demostraron la alta incidencia de arritmias ventriculares graves descriptas en dicho síndrome, a pesar de la similitud electrocardiográfica.

Summary

ELECTROCARDIOGRAPHIC ABNORMALITIES IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISEASES (CEREBRAL T WAVE). CLINICAL STUDY OF 20 CASES.

Although there were previous reports about the occurrence of electrocardiographic changes during acute cerebrovascular accidents [6, 20], *it was only in 1954 that Burch et al* [3] *described a typical electrocardiographic pattern for central nervous system diseases. In spite of subsequent reports and the inclusion of several different neurological lesions, misinterpretation of these changes still remains. Among 20 patients of a retrospective-prospective study with the so-called "cerebral" T wave, 10 were erroneously diagnosed as affected with coronary heart disease (Table 1). In several patients, organic encephalopathy could not be demonstrated. In addition, various of the pathogenic lesions that have been postulated to explain the electrocardiographic abnormalities* [8, 12, 13, 15, 19, 25, 27] *were not found in this series. In contrast, evidence supporting sympathetic nervous system disease as an operative mechanism was present. On the other hand, both the literature* [7, 14, 28, 33] *and our own series suggest an overlap between the "cerebral" T wave changes and the long Q-T syndrome. However, dynamic electrocardiographic records did not show severe ventricular arrhythmias in the former, as has been described in the latter. This finding may indicate that Q-T prolongation should not always be considered an ominous electrocardiographic sign.*

Bibliografía

1. Alessi R, Nusynowitz M, Abildskov JA, Moe GK: Nonuniform distribution of vagal effects on the atrial refractory period. *Am J Physiol* 194: 406, 1958.
2. Beard EF, Robertson JW, Robertson RCL: Spontaneous subarachnoid hemorrhage simulating acute myocardial infarction. *Am Heart J* 58: 755, 1959.
3. Burch GE, Meyers R, Abildskov JA: A new electrocardiographic pattern observed in cerebrovascular accidents. *Circulation* 9: 719, 1954.
4. Burgess MJ, Green LS, Millar K, Abildskov JA: Cancellation of electrocardiographic effects during ventricular recovery. *J Electrocardiol* 2: 101, 1969.
5. Burgess MJ, Green LS, Millar K, Wyatt R, Abildskov JA: The sequence of normal ventricular recovery. *Am Heart J* 84: 660, 1972.
6. Byer E, Ashman R, Toth LA: Electrocardiogram with large upright T waves and long Q-T interval. *Am Heart J* 33: 796, 1947.
7. Crampton R: Preeminence of the left stellate ganglion in the long Q-T syndrome. *Circulation* 59: 769, 1979.
8. Cropp GJ, Manning GW: Electrocardiographic changes simulating myocardial ischemia and infarction associated with spontaneous intracraneal hemorrhage. *Circulation* 22: 25, 1960.
9. Cruickshank JM, Dwyer GN: Electrocardiographic changes in subaracnoid haemorrhage: Role of catecholamines and effects of betablockade. *Br Heart J* 36: 395, 1974.
10. Curtiss EI, Heibel RH, Shaver JA: Autonomic maneuvers in hereditary Q-T interval prolongation (Romano-Ward syndrome). *Am Heart J* 95: 420, 1978.
11. Doroghazi RM, Childers R: Time-related changes in the Q-T interval in acute myocardial infarction: Possible relation to local hypocalcemia. *Am J Cardiol* 41: 684, 1978.
12. Eisalo A, Perasalo J, Halonen PI: Electrocardiographic abnormalities and some laboratory findings in patients with subarachnoid hemorrhage. *Br Heart J* 34: 217, 1972.
13. Feldstein CA, Vilches AA, Olivieri AO, Cohen AA, Burucúa JE: Las manifestaciones electrocardiográficas en las enfermedades del sistema nervioso central. *Rev Argent Cardiol* 46: 163, 1978.
14. Hugenholtz PG: Electrocardiographic changes typical for central nervous system disease after right radical neck dissection. *Am Heart J* 74: 438, 1967.
15. Hunt D, McRae C, Zapf P: Electrocardiographic and serum enzyme changes in subarachnoid hemorrhage. *Am Heart J* 77: 479, 1969.
16. Jachuck SJ, Ramani PS, Clarck F, Kalbag RM: Electrocardiographic abnormalities associated with raised intracranial pressure. *Br Med J* 1: 242, 1975.
17. James TN, Froggatt P, Atkinson WJ, Lurie

PR, McNamara DG, Miller WW, Schloss GT, Carroll JF, North RL: De subitaneis mortibus. XXX. Observations on the pathophysiology of the long Q-T syndromes with special reference to the neuropathology of the heart. *Circulation* 57: 1221, 1978.
18. Koskelo P, Punsar S, Sipilä W: Subendocardial hemorrhages and ECG changes in intracranial bleeding. *Br Med J* 1: 1479, 1964.
19. Kreus KE, Kemilä SJ, Takala JK: Electrocardiographic changes in cerebrovascular accidents. *Acta Med Scand* 185: 327, 1969.
20. Lepeschkin E: Modern Electrocardiography. Baltimore, Williams and Wilkins, Vol. 1, 1951, p 251.
21. Lester RM, Wagner GS: Acute myocardial infarction. *Med Clin North Amer* 63: 3, 1979.
22. Mathews EC, Blount AW, Townsend I: Q-T prolongation and ventricular arrhythmias with and without deafness in the same family. *Am J Cardiol* 29: 702, 1972.
23. Parizel G: Life-threatening arrhythmias in subarachnoid hemorrhage. *Angiology* 34: 17, 1973.
24. Perosio AM, Suárez LD: Diagnóstico electrocardiográfico. Nomenclatura y criterio. Buenos Aires, Ed López, 1973, pp. 173-174.
25. Reddy J: Cardiac rhythm problems in subarachnoid hemorrhage: Report of two patients. *New Zealand Med J* 87: 211, 1978.
26. Reynolds EW, Vander Ark CR: Quinidine syncope and the delayed repolarization syndromes. *Mod Conc Cardiovasc Dis* 45: 117, 1976.
27. Runge PJ, Bousvaros G: Giant peaked upright T waves in cerebrovascular accident. *Brit Heart J* 32: 717, 1970.
28. Schwartz PJ, Periti M, Malliani A: The long Q-T syndrome. *Am Heart J* 89: 378, 1975.
28. Schwartz PJ, Wolf S: Q-T interval prolongation as predictor of sudden death in patients with myocardial infarction. *Circulation* 57: 1074, 1978.
30. Singer PA, Crampton RS, Bass NH: Familial Q-T prolongation syndrome; Convulsive seizures and paroxysmal ventricular fibrillation. *Arch Neurol* 31: 64, 1974.
31. Suárez LD, Chiozza MA, Foye R, Mosso R, Perosio AM: Swallowing-dependent atrial tachyarrhythmias, Their mechanims. *J Electrocardiol* 13: 301, 1980.
32. Vilches AA: Las alteraciones cardiovasculares en las enfermedades del sistema nervioso central. Tesis de doctorado. Biblioteca de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Buenos Aires, 1976, p. 106.
33. Vincent GM, Abildskov JA, Burgess MJ: Q-T interval syndromes. *Prog Cardiovasc Dis* 16: 523, 1974.
34. Wasserman F, Choquette G, Cassinelli R, Bellet S: Electrocardiographic observations in patients with cerebrovascular accidents. Report of 12 cases. *Am J Med Sci* 231: 502, 1956.
35. Watts JW, Fulton JF: The effect of lesions of the hypothalamus upon the gastrointestinal tract and heart in monkeys. *Ann Surg* 101: 363, 1935.
36. Weintraub BM, Lawrence CM: Cardiac abnormalities in subarachnoid hemorrhage: A resume. *Stroke* 5: 384, 1974.
37. Yamour BJ, Sridharaw MR, Rice JF, Flowers NC: Electrocardiographic changes in cerebrovascular hemorrhage. *Am Hearth J* 99: 294, 1980.

— — — —

Much of the history of medicine, it is true, has been a story of trial-and-error, but even its most empirical remedies has been inspired by an idea of some sort — if nothing else, at least the concept of purging an evil spirit from the body.

Gran parte de la historia de la medicina, es cierto, ha sido una historia de "prueba y error", pero aun las medidas más enjuiciadas han sido inspiradas por algún tipo de idea — si no otra cosa, al menos el concepto de echar fuera del cuerpo a un espíritu maligno.

DWIGHT J. INGLE

Life and disease. Basic Books, New York, 1963

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 419-422 (1981)

NON TUBERCULOUS MYCOBACTERIOSES IN BUENOS AIRES

MARTHA DI LONARDO, NELIDA C. ISOLA, MARTHA AMBROGGI, ANA M. DE BIANCHI, ISABEL N. DE KANTOR

Department of Phthisioneumonology, Faculty of Medicine, University of Buenos Aires and Pan American Zoonoses Center (PAHO/WHO)

The frequency of human disease caused by "atypical" or non tuberculous mycobacteria in Latin America is very low, if compared with that of tuberculosis. In the last 15 years, however, several reports on cases of non tuberculous mycobacterioses have been published in Argentina and other countries of that region [1, 3, 6]. This paper presents the results obtained in a cooperative study on the significance of mycobacteria other than tubercle bacilli as a cause of disease in the City of Buenos Aires, Argentina on the basis of cases diagnosed at the Phthisioneumonology Department of the University of Buenos Aires and the Muñiz Hospital, in the same city.

Material and methods

Bacteriological studies: 5182 mycobacterium positive cultures obtained over a two-year period were studied. Most of the cultures had been obtained from lung secretions (sputum, bronchial specimens or gastric aspiration specimens), and, a 3 % of them from other body fluids and tissues (spinal fluid, pleural, pericardial, peritoneal and synovial fluids and tissues from surgical resections, biopsies and autopsies).

— — — —

Received: 19-XI-1980. Accepted: 18-IV-1981.

Postal address: Pan American Zoonoses Center, Casilla Correo Central 3092, 1000 Buenos Aires, Argentina.

Specimens were homogeneized and decontaminated by Petroff's method, and inoculated into two tubes of Lowenstein-Jensen medium and two tubes of Stonebrink medium.

A special study was made at the Pan American Zoonoses Center, (P.A.Z.C.) of the cultures which showed one or both of the following properties: *a)* growth characteristics of colony appearance different from those of *M. tuberculosis*, and *b)* in the case of strains from patients not treated previously, resistance to antimycobacterial drugs, especially to PAS.

The tests employed for identification of the mycobacteria were: rate of growth, growth temperature, colony morphology, photo and scotochromogenicity, niacin and nitrate reduction tests, semi quantitative catalase activity, catalase test at room temperature and after heating at 68° C (20 minutes), Tween hydrolisis, tellurite reduction, iron uptake, growth on McConkey agar, galactosidase and urease activity. When considered necessary, virulence tests for guinea pigs, rabbits and chickens were performed. Three weeks after inoculation, a comparative tuberculin test with human, bovine and avian PPDs was made on each of the inoculated animals. On the sixth week, they were autopsied for the observation of lesions.

Drugs susceptibility tests were conducted following the proportion method of Canetti, Rist and Grosset [2]; the drugs employed were isoniacid (INH), PAS, streptomycin (SM), ethambutol (EMB), Rifampicin (RAMP), and, in some cases capreomycin (CM), Kanamycin (KM) and Ethionamide (ETH).

Chromogenic strains whose characteristics were all similar to those of *M. avium-intracellulare* were classified as *M. avium-intracellulare scrofulaceum* complex (MAIS) when differences within this complex could not be determined with the usual typing test [7]. Strains with the same general characteristics, but non chromogenic in young

cultures were typed as *M. avium-intracellulare*.

Photochromogenic strains, which showed good growth at 37° C, negative nitrate reductase and positive Tween hydrolysis were identified as "photochromogenic strains, Runyon Group I" because of the above-mentioned characteristics which did not fall withing any of the photochromogenic mycobacterial species described.

The criterion followed to consider a strain as the etiologic agent of a mycobacteriosis was:

— more than one isolate from bronchopulmonary secretions, except when the strain was the only one cultured from tissues with granulomatous lesions.

— confirmed disease,

— initial resistance to antituberculous drugs, especially to PAS, coinciding with a slow and poor evolution of the disease.

Immunological studies: Evaluation of humoral immunity was performed on five patients, by determining the total globulin and the different serum immunoglobulins. The methods used were: 1) cellogel acetate electrophoresis of serum proteins; 2) immunoelectrophoretic analysis of serum samples by Scheldegger's micromethod with polivalent antihuman rabbit and/or goat serum and monovalent anti-IgA, IgG and IgM sera; 3) quantitative radial immunodiffusion, following the Mancini *et al* method [6] for IgA, IgG and IgM.

Tests for cutaneous delayed hypersensitivity to human and avian PPDs, prepared at P.A.Z.C., were made on six patients.

Results

Table 1 shows the cases of mycobacterioses other than tuberculosis confirmed over the period of the study, as well as the number of isolates and their origin.

In addition, cultures of several non tuberculous mycobacteria were also obtained, but because they were isolated in one instance only from each patient, they were not considered cause of disease (Table 2).

TABLE 2. — *Non tuberculous mycobacteria isolated on one occasion only from each patient (1977 through 1978)*

Species	Nº of cultures
M avium-intracellulare	2
MAIS *	2
M. gastri	3
M. terrae-triviale complex	1
M. kansassii	10
Photochromogenic strains, Runyon Group I **	4
M. gordonae	1
M. flavescens	2
M. fortuitum complex	5
M. chelonei	1

* **M. avium-intracellulare-scrofulaceum** complex; ** Species could not be determined.

M. kansasii strains which originated 4 out of the 10 cases of confirmed mycobacterioses, were resistant to INH, SM and PAS, and susceptible to EMB and RAMP. The *M. marinum* strain was resistant to INH, SM, PAS and susceptible to EMB, RAMP, KM, CM and ETH.

The strains of the MAIS complex, and two of the *M. avium intracellulare* strains which caused disease, were resistant to INH, SM, PAS, EMB, RAMP, CM, KM and ETH, and the remaining *M. avium-intracellulare* strain was susceptible to KM and ETH and resistant to the other tested antibacillary drugs.

During the period of the study, a total

TABLE 1. — *Cases of non tuberculous mycobacterioses. Department of Phthisioneumonology, and Muñiz Hospital, Buenos Aires, 1977 through 1978*

Patient	Species	Nº of cultures	Origin
MLC	MAIS *	2	Bronchopulmonary secretions
Vas.	*M. kansasii*	4	,, ,,
Cab.	*M. kansasii*	2	,, ,,
Wit.	*M. avium-intracellulare*	5	,, ,,
Mam.	*M. kansasii*	2	,, ,,
J.O.	*M. avium-intracellulare*	6	,, ,,
Mat.	MAIS *	4	,, ,,
del F.	*M. avium-intracellulare*	3	,, ,,
Am.	*M. kansasii*	2	,, ,,
A.P.	*M. marinum*	1	Skin biopsy

* **M. avium-intracellulare-scrofulaceum** complex.

of 5182 mycobacterial cultures were obtained; of these, 5120 were identified as *M. tuberculosis* and 62, as non tuberculous mycobacteria.

These cultures were from 3130 patients; 3120 cases of typical tuberculosis and 10 cases of mycobacterioses, nine of them of pulmonary location and one, a skin granuloma. As a percentage, non tuberculous mycobacterioses represented 0.32 % of all cases. Thirty-one patients from which cultures of non tuberculous mycobacteria were obtained on one occasion only were excluded.

Electrophoretic proteinogram: Two of the five patients examined by electrophoretic proteinogram showed hypergammaglobulinemia and in one of them the gamma globulin levels were below the lowest normal values. However, the total proteinemia was normal in all cases.

Immunoglobulin levels: Two cases showed IgM levels considerably below the lowest value; the IgC was normal in three cases, and higher than normal in the remaining two. The IgA was below the lowest normal level in one patient, above normal values in another one and normal, in the remaining three.

Tuberculin test: Five patients reacted strongly to 2 IU of the human PPD (15-23 mm), one was negative to the same PPD (2 and 20 IU), five reacted to 2 IU of avian PPD (more than 10 mm) and only one was negative.

The above data allow for the supposition that in these cases of mycobacterioses cell-mediated immunity was not depressed.

Discussion

A previous study carried out over a five-year period in the same Department [3], showed 0.19 % of non tuberculous mycobacterioses cases over a total of 4063 mycobacteriosis patients. As shown by the present study the ratio between tuberculosis and other mycobacterioses cases continues to be low (0.32 %).

The patient with skin lesions was the first case of disease due to *M. marinum* reported in Argentina. The patient, who had been in contact with fish ponds since she was 8 years old, showed sporotrichoideous lesions in the arm, with negative mycological tests.

The number of cases in which *M. kansasii* was isolated from sputum samples on only one occasion and in which mycobacterial disease could therefore not be confirmed, should be noted. The natural reservoir of *M. kansasii* continues to be unknow, although it has been cultured in water samples [5] and in the organs of some animals [8]. Its presence in the environment under study is undoubtful; it colonizes in the respiratory tract and, under favourable conditions, may cause disease. The same comments are applicable to *M. avium-intracellulare* isolates which were obtained from the respiratory secretions also in one instance only and which could therefore not be confirmed as disease agent.

With respect to the immunological studies, the number of cases was too small and no characteristic pattern was found with respect to the humoral immunity as measured by the level of serum immunoglobulin in these patients. However, the anomalies observed would justify the inclusion of immunological studies in all cases of mycobacterioses that may be detected in the future.

Summary

A study was made of 5182 positive mycobacterial cultures obtained during the years 1977-1978 in the Department of Phthisioneumonology of the University of Buenos Aires and the Muñiz Hospital, of the same city. Of these, 5120 were identified as M. tuberculosis *and 62 as nontuberculous mycobacteria. The 5182 cultures were from 3130 patients, 3120 of which were typical tuberculosis cases and 10, other, mycobacterioses cases (9 with pulmonary disease and the remaining with a skin granuloma). The percentage of nontuberculous mycobacterioses was 0.32 %. The species or species complexes isolated were* M. kansasii *(four), MAIS (two),* M. marinum *(one) and* M. avium-intracellulare *(three cases).*

Resumen

MICOBACTERIOSIS NO TUBERCULOSA EN BUENOS AIRES.

Se estudiaron 5182 cultivos positivos para micobacterias obtenidos durante los años 1977 y 1978 en el Laboratorio de la Cátedra de Tisioneumonología y del Hospital Muñiz de Buenos Aires: 5120 de ellos eran M. tuberculosis *y 62 micobacterias no tuberculosas. Los cultivos provenían de 3130 pacientes, de ellos 3120 tenían enfermedad producida por* M. tuberculosis *y 10 casos de otras micobacteriosis: 9 de localización pulmonar y uno de un granuloma cutáneo. En 5 de los casos pulmonares el agente causante pertenecía al complejo* M. avium-intracellulare-scrofulaceum *y en los otros 4 a la especie* M. kansasii. *Del granuloma cutáneo se aisló* M. marinum. *Esto representa un porcentaje de 0.32 % de micobacteriosis no tuberculosas, sobre el total de los casos de tuberculosis diagnosticados. Los criterios seguidos para considerar una micobacteria "atípica" o no tuberculosa como agente causante de enfermedad fueron: obtención de más de un cultivo del paciente, salvo cuando la micobacteria fuera la única cultivada de una biopsia de tejidos con lesiones granulomatosas; enfermedad comprobada; resistencia inicial a varias drogas antituberculosas, especialmente al PAS, coincidente con una evolución lenta y difícil de la enfermedad.*

References

1. Andrade L: Micobacteriosis no Brasil. *Revista da Divisão Nacional de Tuberculosis* 20: 97, 1976.
2. Canetti G, Rist N, Grosset J: Mésure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux droges antibacillaires pour la méthode des proportions. *Revue de la Tuberculose (Paris)* 27: 217, 1963.
3. Cetrángolo A, Kantor IN de: Aislamiento de micobacterias atípicas. *Medicina (Bs Aires)*, 29: 186, 1969.
4. Mancini G, Carbonara AQ, Heremans JF: Immunological quantification of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2: 235, 1965.
5. McSwiggan DA, Collins CH: The isolation of *M. kansasii* and *M. xenopi* from water systems. *Tubercle* 55: 291, 1974.
6. Ponce de León L: Frecuencia de micobacteriosis atípicas en pacientes investigados por sospecha de tuberculosis pulmonar. *Boletín del Instituto Bacteriológico de Chile* 18: 38, 1976.
7. Runyon EH: Ten mycobacterial pathogens. *Tubercle* 55: 235, 1974.
8. Worthington RW, Kleeberg HH: Isolation of *M. kansasii* from bovines. *Journal of the South African Veterinary Medical Association* 35: 29, 1964.

— — — —

In 1643 Torricelli showed that a column of mercury was supported by the weight of atmospheric air and not, as his predecessors supposed, by Nature's horror of a vacuum. He observed that the column of mercury varied from day to day. "Nature" he suggested "would not, like a flirtatious girl, have a different horror from one day to the next".

En 1643 Torricelli demostró que una columna de mercurio era sostenida por el peso de la atmósfera y no, como sus predecesores habían supuesto, por el "horror al vacío" de la Naturaleza. Observó que la columna de mercurio variaba de día en día. "La Naturaleza" sugirió "no tendría, como si fuera una chica coqueta, un horror diferente de un día para otro".

JONATHAN MILLER

The body in question, 1978

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 423-430 (1981)

DEPURACION PLASMATICA DE RADIOCOLOIDES EN LAS HEPATOPATIAS ALCOHOLICAS

F. V. M. ADARO, HERCILIA D. COPELLO, OLGA I. CASAL, O. R. ABELLA, F. C. MOLLERACH, C. ALMEIDA, G. E. BUR, J. E. DUHART

Servicios de Clínica Médica y Medicina Nuclear, Complejo Hospitalario Policial Churruca - Visca, Buenos Aires

El hígado normal se presenta habitualmente como una masa compacta de hepatocitos distribuidos en lobulillos, notablemente homogénea ante las distintas pruebas funcionales; esto se debería a que todos los lobulillos serían anatómica y funcionalmente idénticos, actuando en un nivel metabólico similar. Es sabido que uno de los principales efectos de la ingesta prolongada de etanol es la de provocar grados variables de daño hepático. Este daño, visualizado histológicamente como modificaciones de distinta magnitud en la estructura normal, se expresa como un déficit en el número de hepatocitos funcionantes y grados variables de obstrucción biliar y vascular. Otra de las consecuencias importantes de las alteraciones anatómicas producidas por el tóxico es la pérdida del carácter homogéneo del hígado. Un ejemplo extremo de esta falta de homogeneidad es el desarrollo de cortocircuitos vasculares intrahepáticos ("fístulas de Eck internas") [10] que pueden provocar cuadros de grave compromiso del sensorio. Dentro del diagnóstico por imágenes, esta falta de homogeneidad se expresa a través del aspecto moteado de distribución irregular del radiocoloide observado en la centellografía hepática estática de las hepatopatías difusas [5]. El motivo del presente trabajo fue el aprovechar las propiedades fagocíticas de las células de Kupffer para objetivar dinámicamente el grado de compromiso en la distribución de la circulación intrahepática de las hepatopatías alcohólicas. En base a estos estudios se trató de evaluar la importancia que este tipo de fenómeno puede llegar a tener en la evolución clínica del paciente y aprovecharlo con fines diagnósticos.

Recibido: 9-I-1981. Aceptado: 8-IV-1981.

Dirección postal: Hospital Churruca, Uspallata 3400, 1437 Buenos Aires, Argentina.

Material y métodos

Fueron estudiados 21 pacientes con hepatopatías alcohólicas atendidos en el Servicio de Clínica Médica. En todos ellos, además de los estudios habituales y de las determinaciones de funcionalismo hepático, se efectuó punción biopsia hepática bajo control laparoscópico.

Los pacientes fueron divididos, de acuerdo a la histología hepática, en dos grupos: 11 pacientes con severo daño hepático atribuible al etilismo (destrucción celular, infiltración grasa, cambios inflamatorios, fibrosis, etc.) pero que no llegaban a configurar la imagen típica de la cirrosis de Laennec (Fig. 1), y 10 pacientes con cirrosis hepática confirmada, los cuales mostraban los criterios habituales de destrucción y neoformación del parénquima hepático con fibrosis y destrabeculación (Fig. 2). Los estudios con radiocoloides fueron efectuados, además, en 6 sujetos normales que actuaron como controles.

La depuración plasmática de radiocoloides fue estudiada con Sulfuro de Tecnecio 99 mm, del cual fueron administrados 5 mCi a cada paciente. La inyección endovenosa fue realizada mediante técnica de bolo, en posición decúbito dorsal bajo la cámara de centelleo, de modo tal que el ca-

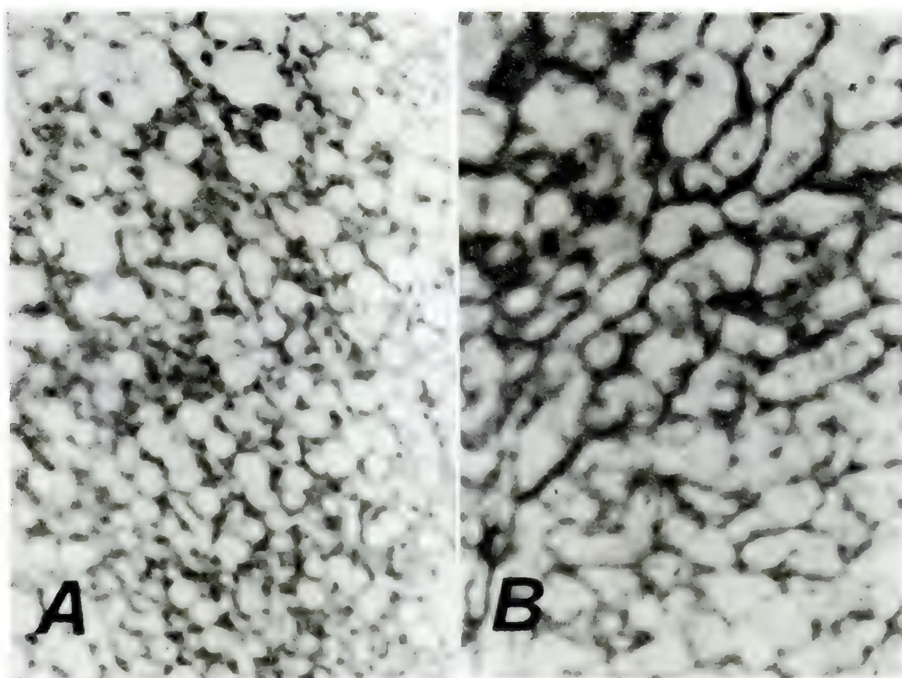


Fig. 1. — **A**, Hígado con degeneración grasa masiva, abundantes quistes grasos y atrofia del parénquima. HE x 180; **B**, Retículo del parénquima con ruptura de las trabéculas y desaparición donde hay quistes grasos. Retículo Río Ortega x 180.

bezal abarcara el precordio, el hígado y el bazo. El instrumental empleado fue una cámara Ohio Nuclear Sigma 410 con procesador VIP 450 y colimador de alta resolución y baja energía. La adquisición se inició inmediatamente después de la inyección, obteniéndose imágenes de 30 segundos cada una durante 25 minutos, es decir 50 imágenes en total.

Para el análisis se estableció un área de interés en el lóbulo derecho hepático, representativa de la actividad predominante en la totalidad del parénquima, obteniéndose a continuación, mediante un programa preestablecido, una curva de actividad/tiempo (Fig. 3). Sobre dicha curva se determinaron los siguientes valores: *a*) actividad máxima en la meseta de la curva (A(∞)); *b*) tiempo transcurrido hasta obtener el 50 % de dicha actvidad (t(.5)), y *c*) tiempo transcurrido hasta llegar al 90 % de la misma (t(.9)).

Resultados

En la Tabla 1 se registran las características clínicas y los resultados de la depuración de radiocoloides. Vemos que el grupo de pacientes con cirrosis era de de mayor edad (mayor tiempo de acción de la noxa), presentaba similar frecuencia de hepatomegalia y mayor proporción de esplenomegalia que el grupo no cirrótico.

Entre los cirróticos dos pacientes evidenciaron ascitis y tres hemorragia digestiva, mientras que ninguno de los pacientes sin cirrosis presentó dichas complicaciones.

Los tiempos requeridos para alcanzar el 50 % y el 90 % del valor máximo en la captación hepática del radiocoloide (t(.5) y t(.9)) estaban aumentados en el grupo de hepatopatías alcohólicas sin cirrosis con respecto a los normales, siendo esta elevación marcadamente menor en el grupo de los pacientes cirróticos.

En la Tabla 2 se registran los resultados de algunas de las determinaciones bioquímicas efectuadas en nuestros pacientes. En la misma puede observarse una deficiente depuración de la bilirrubina, especialmente en los cirróticos.

Hay indicios de destrucción celular (elevación de las transaminasas, en especial la transaminasa glutámico oxalacética en los cirróticos), lo cual señala la evolutividad de la injuria a los hepatocitos.

La síntesis de proteínas y polipéptidos se halló comprometida, con descenso de la albúmina y protrombina, manteniéndose

TABLA 1. — *Características clínicas de los sujetos normales y de ambos grupos de pacientes etilistas*

Grupo	Edad (años ± ES)	Hepatomegalia (%)	Esplenomegalia (%)	Ascitis (%)	Hemorragia digestiva (%)	t(.5) (min ± ES)	t(.9) (min ± ES)
Normales	44.6 ± 7.5	0	0	0	0	1.59 ± 0.19	6.71 ± 1.25
Hepatopatías sin cirrosis	50.4 ± 3.6	64	36	0	0	2.34 ± 0.34	9.99 ± 1.14
Hepatopatías con cirrosis	56.9 ± 3.1	70	60	20	30	1.60 ± 0.26	8.63 ± 0.96

Los porcentajes indican la frecuencia con que estos hallazgos se presentaron en cada grupo. t(.5) y t(.9) son los tiempos necesarios para alcanzar el 50 % y el 90 % del valor máximo.

normal la actividad de la pseudocolinesterasa.

El grupo cirrótico, a diferencia del de las hepatopatías alcohólicas no cirróticas, mostró un discreto aumento de la gamma glutamil transpeptidasa, hallazgo común en los etilistas.

En ambos grupos, en especial en el de los pacientes cirróticos, se halló evidencia de aumento en la síntesis de inmunoglobulina con elevación de la gammaglobulina plasmática.

Discusión

Hay ciertas divergencias sobre los criterios empleados para calificar de alcoholista a un paciente; los mismos varían entre la detallada enunciación del Consejo Nacional de Alcoholismo (USA) [2] que se fundamenta tanto en el consumo diario de alcohol como en el grado de compromiso síquico del paciente, hasta el de aquellos que consideran alcoholista a todo paciente que bebe más que su médico. En

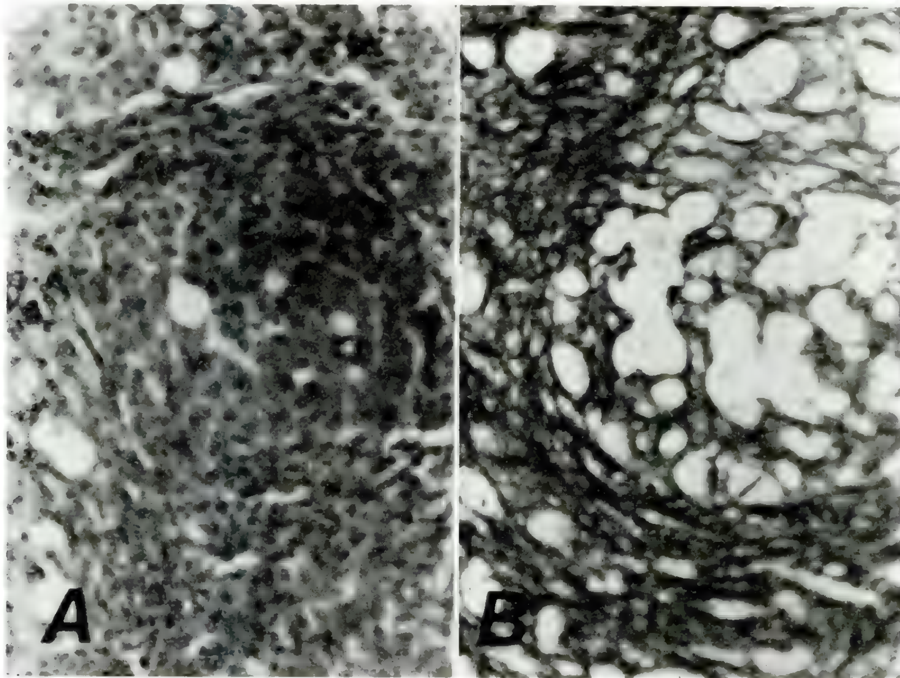


Fig. 2. — **A**, Nódulo de regeneración con áreas de parénquima comprimido y con degeneración grasa e infiltrados linfocitarios. HE x 180; **B**, Retículo alrededor de la zona de regeneración nodular. Formación de seudos anillos por necrosis y regeneración conjuntivo-reticular. Retículo Río Ortega x 180.

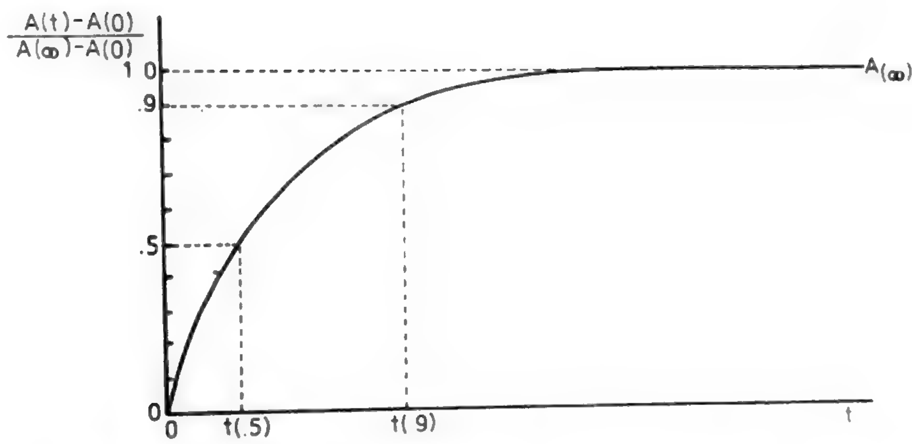


Fig. 3. — Método empleado para evaluar la depuración del radiocoloide. Se ha graficado la evolución temporal de la actividad medida a nivel del hígado, señalándose los puntos de actividad máxima y el 90 % y 50 % de la misma. **A(∞)** es la actividad máxima; **A(0)** es la actividad inicial; **A(t)** es la actividad al tiempo **t**; **t(.9)** y **t(.5)** son los tiempos transcurridos hasta alcanzar el 90 % y el 50 % de la actividad máxima.

el presente estudio tomamos como base el consumo de más de 2.5 litros de vino por día (o su equivalente en etanol) para considerar que la cantidad de alcohol ingerida era lo suficientemente importante como para producir daño hepático.

La fagocitosis del radiocoloides por las células del sistema retículo endotelial ha sido aprovechada en estudios estáticos y dinámicos. En los primeros se la ha empleado para delimitar la silueta del hígado y el bazo, mostrando en el caso de las hepatopatías alcohólicas no sólo cambios en el tamaño de ambos órganos sino también distribución irregular del radiocoloide en el hígado y captación aumentada del mismo por el bazo y la médula ósea. A este respecto es interesante destacar que hay autores que postulan [12] que la elevación de las globulinas plasmáticas observada en este tipo de pacientes (Tabla 2) se debería al aumento en la carga inmunitaria procedente del tubo digestivo al sistema retículo endotelial extrahepático ocasionado por los cortocircuitos vasculares intrahepáticos. De tal suerte ciertos antígenos que en individuos normales son fagocitados por las células de Kupffer sin producir anticuerpos, en la cirrosis llegarían al resto del sistema retículo endotelial donde serían captados y estimularían la producción de inmunoglobulinas por las células inmunocompetentes. En los estudios dinámicos se ha determinado la velocidad con que el coloide inyectado desaparece de la sangre circulante [4] o de su

Tabla 2. — *Resultados de las pruebas de función hepática de los sujetos normales y de ambos grupos de pacientes etilistas*

Grupo	Bilirrubina (mg/100 ml ± ES)	TGO (mU/ml ± ES)	TGP (mU/ml ± ES)	T. Protrombina (% ± ES)	Albúmina (g/100 ml ± ES)	CHE (mU/ml ± ES)	γ GT (mU/ml ± ES)	γ Globulina (g/100 ml ± ES)
Normales	< 1.2	< 12	< 12	100	> 4.0	> 1500	< 28	< 1.4
Hepatopatías sin cirrosis	1.3 ± 0.3	25.2 ± 6.5	33.4 ± 13.4	85.6 ± 4.6	3.6 ± 0.2	2004 ± 386	58.7 ± 19.5	1.6 ± 0.3
Hepatopatías con cirrosis	2.8 ± 1.1	43.5 ± 7.9	28.4 ± 2.8	74.6 ± 7.5	3.0 ± 0.2	2098 ± 515	113.2 ± 39.1	1.9 ± 0.2

TGO = transaminasa glutámico oxalacética; TGP = transaminasa glutámico pirúvica; CHE = seudocolinesterasa sérica; γ GT = gamma glutamil transpeptidasa.

inversa, la velocidad de depósito del radiocoloide en el hígado [3]. Dicha velocidad es habitualmente expresada en base a un parámetro k, que es la fracción del radiocoloide presente en un momento determinado que es captada por el sistema retículo endotelial por unidad de tiempo (o, dicho de otro modo, la fracción de la volemia que es depurada de radiocoloide por unidad de tiempo [4], siendo por lo tanto k la suma de las depuraciones individuales de los distintos sectores del sistema retículo endotelial. De Nardo [3] ha mostrado que en sujetos normales la relativa contribución de los diferentes sectores a la depuración total consistiría de 77 % para el hígado, 7 % para el bazo y 16 % para la médula ósea, mientras que en los pacientes cirróticos estas proporciones serían de 35 % para el hígado, 16 % para el bazo y 49 % para la médula ósea.

La base de los estudios dinámicos estriba en medir la pendiente k de los cambios (en escala semilogarítmica) de la actividad del radiocoloide con respecto a la actividad final. Dicha evolución temporal estaría teóricamente determinada por una función monoexponencial.

$$\frac{A(t) - A(\infty)}{A(0) - A(\infty)} = e^{-kt}$$

siendo A(t) la actividad medida al tiempo t, A(0) la actividad inicial y A(∞) la actividad comprobada una vez que se completó la fagocitosis de las partículas. Es de hacer notar que esta ecuación es válida para cualquier punto en que se efectúe la medición (sangre, bazo o hígado). Es obvio que para esta determinación tenga sentido el valor de k debe permanecer constante a lo largo del tiempo. Sin embargo, ya las primeras publicaciones sobre el tema [4] describen una exponencial múltiple en el curso de la desaparición plasmática de las partículas y se supuso que este fenómeno era debido a la falta de homogeneidad en el tamaño de las partículas inyectadas [4, 8]. El primer componente (rápido) de esta curva fue atribuido a la fagocitosis de las partículas de gran tamaño por el sistema retículo endotelial del hígado y el bazo; los componentes restantes (lentos) se creyeron provocados por la lenta remoción de las

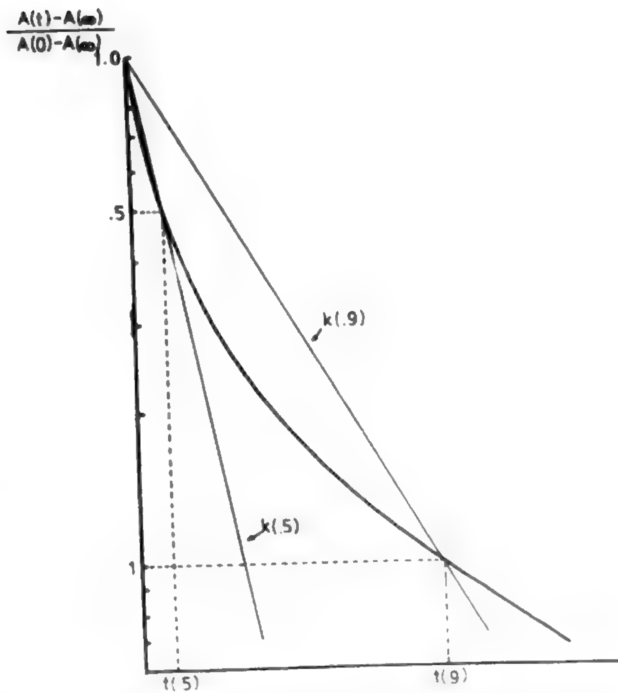


Fig. 4. — Principio empleado para calcular las pendientes **k(.5)** y **k(.9)**. **A**(∞) es la actividad máxima; **A(0)** es la actividad inicial; **A(t)** es la actividad al tiempo **t**; **t(.5)** y **t(.9)** son los tiempos transcurridos hasta alcanzar el 50 % y el 90 % de la actividad máxima.

partículas muy pequeñas por las células del sistema retículo endotelial ubicadas en la médula ósea. El procedimiento empleado por la mayor parte de los autores [4, 9, 11, 13] para estimar k es la determinación de la pendiente del componente inicial rápido de la desaparición del radioicoloide inyectado, no tomando en consideración la porción final de la curva al interpretarla como debida a un artefacto. En la Figura 4 hemos graficado el principio seguido por nosotros para calcular el valor de k sobre la base de los trazados obtenidos en nuestros pacientes. Dichos valores fueron calculados para los dos tiempos medidos, t(.5) y t(.9), obteniéndose distintos valores de k en cada determinación. En la Tabla 3 se pueden observar los valores de k obtenidos en los casos normales y en los dos grupos de pacientes estudiados; dichas cifras son ligeramente superiores a las descriptas por otros autores. Es así como Mundschenk [8] empleando coloides de sulfuro de tecnecio halló valores de k que oscilaban entre 0.165 y 0.476 min^{-1} en sujetos normales, mientras que Shaldon [11] con albúmina coloidal refiere valores de 0.339 en normales y 0.236 min^{-1} en pa-

TABLA 3. — *Valores de las velocidades de depósito del radiocoloide en el sistema retículo endotelial medidas al 50 % y al 90 % de la actividad máxima*

	k(.5) (min $^{-1}$ ± E.S.)	k(.9) (min $^{-1}$ ± E.S.)	k(.5)/k(.9) (± E.S.)
Normales	0.48 ± 0.07	0.41 ± 0.08	1.16 ± 0.09
Hepatopatías sin cirrosis	0.37 ± 0.06	0.26 ± 0.03	1.50 ± 0.25
Hepatopatías con cirrosis	0.58 ± 0.11	0.31 ± 0.03	1.82 ± 0.15

k(.5) corresponde al 50 % de la actividad máxima y k(.9) al 90 % de la actividad máxima.

cientes cirróticos. En nuestros casos las diferencias halladas entre normales, hepatopatías alcohólicas no cirróticas y cirróticas no fueron significativas. Sin embargo, más que el valor absoluto de *k*, la diferencia más llamativa entre los tres grupos fue la observada entre los valores de *k* calculados para ambos tiempos, t(.5) y t(.9). En la Tabla 3 vemos que en los tres grupos estudiados *k(.5)* fue significativamente superior a *k(.9)* ($p < 0.05$), siendo esta característica expresada como el cociente entre ambas *k* (*k(.5)/k(.9)*). Puede entonces observarse (Tabla 3) marcadas diferencias entre los tres grupos para esta relación. Podemos así decir que en los sujetos normales *k*(.5) es un 16 % superior a *k(.9)*; que esta diferencia se eleva a un 50 % en las hepatopatías alcohólicas no cirróticas, llegando a ser de un 82 % en el grupo de pacientes con cirrosis. Esta relación fue significativamente diferente en ambos grupos con respecto a los normales ($p < 0.01$). Hemos visto que todos los autores han comprobado que la evolución temporal de la captación de partículas de radiocoloide no es monoexponencial [3, 4, 8, 11, 15]. Es obvio que debido a este motivo el cálculo de *k* en dos tiempos diferentes debe dar un valor distinto de *k* para cada tiempo considerado y esto es precisamente lo que hemos observado en los tres grupos. Hemos hallado asimismo (y esto no ha sido reportado anteriormente) un aumento en la desviación del curso monoexponencial con el compromiso hepático creciente. Esta observación puede ser tomada como evidencia de que la relación *k(.5)/k(.9)* refleja en buena medida la falta de homogeneidad en el grado de perfusión de las células de Kupffer. Creemos que esta es una explicación más satisfactoria que aquella basada en diferencias de tamaño entre las partículas. Si tal fuera el caso hubiera cabido esperar un comportamiento similar de los tres grupos ante las partículas más pequeñas, a menos que el alcohol hubiera modificado en forma irregular las características fagocitarias de las células del sistema retículo endotelial.

Es así que la irregular distribución sanguínea intrahepática llevaría a una precoz saturación de las células de Kupffer en las zonas del hígado provistas de alta perfusión, con posterior y lenta depuración en las zonas de baja perfusión. Esta saturación o bloqueo del sistema retículo endotelial con partículas ha sido descripta por numerosos autores y parecería deberse a un mecanismo de inhibición competitiva [1]. La misma aparentemente tendría características distintas a la saturación del sistema retículo endotelial esplénico por complejos inmunes descripta en enfermedades que, como el lupus eritematoso diseminado y la artritis reumatoidea presentan durante su evolución cifras elevadas de complejos inmunes circulantes [6, 14]. En dichas enfermedades, si bien la captación esplénica de eritrocitos dañados por el calor se halla notablemente disminuida, la captación de partículas coloidales por las células de Kupffer se halla normal o aumentada.

Desde el punto de vista del funcionalismo hepatocelular la irregular distribución sanguínea intrahepática haría que aquellas zonas del hígado con exagerada perfusión para el número de hepatocitos de la misma, sin llegar a configurar un verdadero cortocircuito recibirían sangre muy por en-

cima de las necesidades de dichos hepatocitos (y de su capacidad de metabolizar las sustancias aportadas). Por otra parte, otras zonas del hígado serían irrigadas por una cantidad escasa de sangre que, sin llegar a configurar una isquemia, recibirían sangre muy por debajo de la capacidad metabólica de sus hepatocitos. Estos dos fenómenos actuando simultáneamente podrían hacer que en hepatopatías difusas del tipo de las presentadas en este estudio, la masa de hepatocitos funcionalmente activos con máxima eficiencia fuera muy inferior a la masa de hepatocitos hallada morfológicamente.

En conclusión, creemos que la relación *k(.5)/k(.9)* es exponente de una de las principales características de las hepatopatías alcohólicas, la irregular distribución de la circulación intrahepática, a la cual le daría una expresión dinámica y cuantitativa que nos permitiría comparar distintos pacientes entre sí.

Resumen

Con el objeto de estudiar la influencia del daño inducido por el alcohol sobre la captación hepática de radiocoloides, fueron estudiados tres grupos de pacientes con deterioro creciente de la arquitectura hepática: un grupo de sujetos normales, un grupo de hepatopatías alcohólicas que no llegaban a configurar el cuadro histológico de cirrosis y un grupo de cirrosis. En todos ellos, además de efectuar una biopsia hepática y pruebas funcionales, se estudió en forma dinámica la captación hepática de un radiocoloide luego de su inyección en una vena periférica. La actividad a nivel del hígado fue medida externamente con una cámara gamma, analizándose la evolución temporal de dicha actividad hasta que la depuración plasmática fue completa. En todos los casos estudiados se comprobó que dicha evolución se apartaba de un curso monoexponencial. La determinación de la pendiente (logaritmo de dicha concentración a lo largo del tiempo) en dos puntos diferentes (50 % y 90 % del valor final) mostró que, al aumentar el grado de compromiso en la estructura hepática, crecía la diferencia entre ambas pendientes. Se considera que este hallazgo puede ser tomado como evidencia de la irregular distribución sanguínea intrahepática y que el cociente entre ambas pendientes puede ser utilizado como un índice del grado de compromiso de la misma.

Summary

PLASMA RADIOCOLLOIDS IN ALCOHOLIC LIVER DISEASE.

Although methods for measuring colloidal clearance rates have been described, they are not commonly used. Most clinicians rely on the visual inspection of liver scans, examining the relative radiocolloid accumulation in the liver, spleen and bone marrow and look for the degree of homogeneity in the liver radiocolloid distribution. This method lacks objectivity, however and only indirectly reflects the rate and peculiarities of radiocolloid clearance. One of the main characteristics of normal liver, its striking homogeneous histological architecture, is specially disturbed by the hepatocellular damage induced by ethanol. To study the relationship between morphological changes and liver colloidal uptake, we have employed a noninvasive kinetic technique. A total of 27 subjects were studied: 6 were normal, 11 were alcoholic patients in which the hepatic biopsy showed liver damage although without configurating a typical cirrhosis and 10 were patients with histologically confirmed cirrhosis. Needle biopsy of the liver was performed in all patients besides the usual tests of liver function (Table 2). The subjects were placed in the supine position and 5mCi of 99mTc-sulphur colloid was injected intravenously. A scintillation camera was positioned to view the entire liver and spleen from the anterior aspect. A video-tape recorder was used to record the time-activity data from the camera during 25 min after the injection. After the test, an area of interest on the liver was

selected with the video-tape playback system (Fig. 3). On the records, the time elapsed to reach 50 % and 90 % (t(.5) *and* t(.9)) *of the end activity of the liver (plateau) were measured (Table 1). On the basis of these times, the slope of the colloid uptake by the reticulo endothelial system* (k) *was calculated (Table 3). Two different* k *values* (k(.5) *and* k(.9)) *were obtained on the basis of* t(.5) *and* t(.9). *The ratio of these two slopes* (k(.5)/k (.9)) *was greatly influenced by the degree of liver derangement and indicated the extent of deviation in the theoretical monoexponential course of the process of radiocolloid uptake. It was found that this ratio ranged between 1.16 in normal subjects to 1.82 in cirrhotic patients. These findings are taken as an evidence of the development of unequal intrahepatic blood flow distribution and could be accounted for as an index of the functional consequences of the distorted liver anatomy.*

Bibliografía

1. Bergoc RM, Caro RA: The kinetics of the phagocytosis of gelatin stabilized radiogold colloids in the rat under reticuloendothelial "blockade". *Rev Biol Med Nucl* 5: 39, 1973.
2. Criteria Commitee, National Council on Alcoholism: Criteria for the diagnosis of alcoholism. *Ann Intern Med* 77: 249, 1972.
3. De Nardo SJ, Bell GB, De Nardo GL, Carretta RF, Scheibe PO, Imperato TJ, Jackson PE: Diagnosis of cirrosis and hepatitis by quantitative hepatic and other reticuloendothelial clearance rates. *J Nucl Med* 17: 449, 1976.
4. Dobson EL, Jones H: The behavior of intravenously injected particulated material: its rate of disappearance from the blood stream as a measure of liver blood flow. *Acta Med Scandinav* (Supp 273) 144: 1, 1952.
5. Drum DE, Beard JO: Liver scintigraphic features associated with alcoholism. *J Nucl Med* 19: 154, 1978.
6. Frank MM, Hamburger MI, Lawley TJ, Kimberly RP, Plotz PH: Defective reticuloendothelial system Fc-receptor function in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 300: 518, 1970.
7. Lelbach W: Epidemiology of alcoholic liver disease. Progress in liver diseases. Volumen V. Ed.: Popper, H. "Schafner, F.", New York, 1976, p 494.
8. Mundschenk H, Hromec A, Fischer J: Phagocytic activity of the liver as a measure of hepatic circulation. A comparative study using 198 Au and 99 m Tc-sulfur colloid. *J Nucl Med* 12: 711, 1971.
9. Playoust MR, Mc Rae J, Borden RW: Inefficient hepatic extraction of colloidal gold resulting in inaccuracies in determination of hepatic blood flow. *J Lab & Clin Med* 54: 728, 1959.
10. Popper H, Elias H, Petty DE: Vascular pattern of the cirrhotic liver. *Am J Path* 22: 717, 1952.
11. Shaldon S, Chiandussi L, Guevara L, Caesar J, Sherlock S: The estimation of hepatic blood flow and intrahepatic shunted blood flow by colloidal heat-denaturated human serum albumin labelled with ^{131}I. *J. Clin Invest* 40: 1346, 1961.
12. Thomas HC, Mc Sween RNM, White RG: Role of the liver in controlling the immunogenicity of commensal bacteria in the gut. *Lancet* 1: 1288, 1973.
13. Vetter H, Falkner R, Neumayr A: The disappearance rate of colloidal radiogold from the circulation and its application to the estimation of liver blood flow in normal and cirrhotic subjects. *J Clin Invest* 33: 1594, 1954.
14. Williams BD, Pussell BA, Lockwood CM, Cotton C: Defective reticuloendothelial system function in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1: 1311, 1979.

— — — —

No compete a la fisiología la explicación de las causas finales, definitivamente renunciaron a ella los fisiólogos desde Claudio Bernard. Es nuestro cometido, hombres dados a la ciencia experimental, la observación del fenómeno, procurando su interpretación. Y el fenómeno que hoy se nos muestra a los ojos maravillados es réplica en lo visceral, vegetativo, de lo que hace la voluntad consciente e intencionada.

AUGUSTO PI SUÑER

Los mecanismos de correlación fisiológica, 1920

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 431-438 (1981)

MECHANISM OF POTASSIUM SECRETION IN CHRONIC RENAL FAILURE STUDIED BY MEANS OF AMILORIDE

N. L. YEYATI, D. PRIGOLLINI, R. CREPARULA, E. BARRERA, G. PERTZOV, L. A. BARRERA, D. GOTLIEB

Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

The ability to maintain K balance even in very advanced stages of chronic renal failure (CRF) is due to an increase in the K excretion capacity through the remnant nephron [7, 32, 35]. The findings of micropuncture studies conducted in rats with experimentally induced CRF, made it possible to infer that K reabsorption by the proximal and distal convoluted tubules remains unchanged, increased K excretion resulting from tubular secretion in segments beyond the convoluted distal tubules [2]. Nevertheless, recently in chronic uremic rats, Kunau and Whinnery [25] demonstrate that fractional K reaches the early distal tubules and K secretion in late distal tubules increases when the nephron population is reduced. The increased tubular secretion in uremic rats with normal potassium intake is associated with an increased ATPase Na-K dependent activity in the outer medulla [38]. Similar changes have been observed in normal rat kidneys, subjected to chronic K overloads [37]. The adaptive changes are prevented by the selected removal of the renal papilla in uremic [14] and non-uremic rats subjected to a K overload [13]. Amiloride is a K sparing diuretic [1] that inhibits the entrance of Na into the cells [4]. Indeed amiloride has been shown to inhibit the transtubular potential difference responsible for distal K secretion [11, 40]. The site of action appears to be the distal convoluted tubule and cortical collector duct [11, 17, 19, 31, 40]. In experimental dogs with normal K intake, we could identify two mechanisms of tubular K secretion [47], one accounting for 90 % of the K excreted is inhibited by amiloride, and the other one is not affected even by high doses of amiloride. The aim of the present study was to investigate the effects of acute amiloride administration on the K excretion in CRF patients [49]. From the foregoing introduction, it can be inferred that these patients provide an excellent model for the study of renal mechanisms regulating K excretion. In fact, due to the marked increase in K excretion per nephron occurring in these patients, all the renal mechanisms of K excretion, either active or passive, should be presumably exacerbated in order to maintain K balance. Bearing all these facts in mind, we proceeded to evaluate the effects of amiloride on K, Na and Cl excretion in 8 patients with CRF whose glomerular filtration rate (GFR) was lower than 26 ml/mn. The results were compared with those obtained in 4 normal subjects.

— — — —

Received: 28-VIII-1980. Acepted: 11-III-1981.

Postal address: Sección Nefrología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Córdoba 2351, 1120 Buenos Aires, Argentina.

Material and methods

A moderate water diuresis was induced in 8 patients with CRF of different etiologies (5 glomerulonephritis, 2 pyelonephritis and 1 polycystic kidney) by oral administration of 500 ml tap water. GFR was measured by a continuous infusion of ^{135}I. Iodothalamate at a rate of 0.5 μCi per minute, in normal saline. Urine was collected through an indwelling catheter and complete emptying of the bladder at the end of the periods was assured by appropriate air washouts. After 40 minutes equilibration, three 10 min control periods were obtained and a priming dose of amiloride (0.6 mg/kg body weight) was administered followed by inrtavenous infusion of 0.6 mg/kg body weight hour at a rate of 0.115 ml/mn. Ten minutes after the priming dose of amiloride, three experimental 10 min periods were collected in identical fashion. A blood sample was drawn at the midpoint of each collection period. An identical protocol was followed in the 4 normal subjects. All infusions were delivered by a Harvard pump. Urine and plasma radioactivities were measured in a well scintillation counter, Na and K by flame photometry (IL Instruments) and Cl by a coulombmeter titration. ^{135}I odothalamate clearance (C_{ITM}) was used as an index of GFR [26].

The excretion of Na, K and Cl was expressed as per cent of the filtered load (fractional excretion) and as μEq/min/100 ml GFR. In each experiment data from three periods were averaged providing one value for each. Student's t test for paired values was used in the statistical analysis of the data. The results are present as mean $\pm$ 1 standard error (SEM).

Results

Effects of Amiloride in normal subjects

Table 1 shows the effects of amiloride on C_{ITM}, Na, Cl and K serum concentration in normal subjects. As can be seen, the change in C_{ITM} were not significant. Table 2 shows that the excretion of Na increased and K excretion decreased in all cases, but the changes in Cl excretion were variable and not significant. Table 3 shows that fractional excretion of Na (FE_{Na}) increased from 2.33 $\pm$ 0.28 per cent to 3.41 $\pm$ 0.60 per cent (+ 1.33 $\pm$ 0.36, $p < .025$). On the contrary as can be seen in Table 4, fractional excretion of K (FE_K) was reduced from 25.50 $\pm$ 5.50 per cent to 7.00 $\pm$ .72 per cent (–18.5 $\pm$ 6.2, $p < .05$). The modification in the fractional excretion of Cl (FE_{Cl}) was not significative (Table 5). When the excretion of ions was expressed in μEq/min/100 ml GFR, we see that the Na excretion rose from 271 $\pm$ 56 to 430 $\pm$ 76 (+ 158 $\pm$ 48, $p < .05$) (Table 3). The excretion of K decreased from 98.7 $\pm$ 19.7 to 34.7 $\pm$ 5.8 (–63.9 $\pm$ 14.6, $p < .0125$) (Table 4). The decrease in Cl excretion from 310 $\pm$ 39 to 270 $\pm$ 16 (– 40.7 $\pm$ 19.1) was not significant (Table 5). The ratio between increase of Na excretion and decrease of K excretion was 2.09 $\pm$ 1.10 ($p < .05$).

Effects of Amiloride in patients with CRF

As can be seen in Table 1, C_{ITM} in control periods ranged from 1.8 ml/mn (patient 7) to 26.7 ml/mn (patient 6), plasma Na, Cl, and K were not changed. C_{ITM} was not altered. Na excretion increased and K excretion decreased in all patients, changes of Cl excretion were variable and not significant (Table 2).

Mean basal FE_{Na} (Table 3) was high in patients with CRF, control values

TABLE 1. — *Effects of Amiloride on Iodothalamate Clearance (C_{ITM}) sodium, choride and potassium plasma concentration, in normal subjects and in chronic renal patients (CRP)*

Normal subjects	C_{ITM} ml/min		P_{Na}		P_{Cl} mEq/l		P_K	
(4)	C	A	C	A	C	A	C	A
Mean	110.0	99.5	136	136	102	104	4.4	4.4
SEM	11.9	12.0	0.7	3.7	4.4	3.1	0.4	0.45
CRP (8)								
Mean	13.3	15.9	127	127	106	107	4.3	4.3
SEM	7.6	7.9	5.5	7.6	6.9	5.6	0.7	0.7

C: Control periods; A: periods after amiloride administration.

TABLE 2. — *Effects of Amiloride on urinary sodium excretion ($U_{Na}V$), Potassium excretion (U_KV) and Chloride excretion ($U_{Cl}V$), in normal subjects and in patients with CRF*

Normal subjects	$U_{Na}V$		$U_{Cl}V$ µEq/min		U_KV	
(4)	C	A	C	A	C	A
Mean	302	463	299	315	105	30
SEM	53	100	36	81	21	7
CRP (8)						
Mean	239	297	263	254	74.3	20.4
SEM	60	50	63	49	15.2	5.1

C: Control periods; A: periods after amiloride administration.

TABLE 3. — *Effects of Amiloride on FE_{Na} and Na excretion expressed as µEq/min/100 ml GFR in normal subjects and patients with advanced CRF*

Normal subjects	FE_{Na} %		Paired difference	$O_{Na}V$ µEq/min/100 ml GFR		Paired difference
(4)	C	A		C	A	
Mean	2.33	3.41	1.33	271	430	158
SEM	0.28	0.60	0.36	56	76	48
p			.025			.05
CRP (8)						
Mean	15.62	20.52	4.89	1919	2.631	614
SEM	2.36	3.23	1.45	396	410	178
			.025			.01

C: Control periods; A: periods after amiloride administration.

TABLE 4. — *Effects of Amiloride on FE_K and K excretion expressed as µEq/min/100 ml GFR, in normal subjects and patients with advanced*

Normal subjects	FE_K %		Paired difference	O_KV µEq/min/100 ml GFR		Paired difference
(4)	C	A		C	A	
Mean	25.50	7.00	18.50	98.7	34.7	63.9
SEM	5.50	0.72	6.20	19.7	5.8	14.6
p			0.05			0.0125
CR (8)						
Mean	131.50	39.50	104.80	642.0	201.8	446.4
SEM	38.00	8.30	22.30	116	44.6	93.5
p			0.0025			0.0025

C: Control periods; A: periods after amiloride administration.

TABLE 5. — *Effects of Amiloride on FE_{Cl} and chloride excretion expressed as µEq/min/100 ml GFR in normal subjects and patients with advanced CRF*

Normal subjects	FE_{Cl} %		Paired difference	$O_{Cl}V$ µEq/min/100 ml GFR		Paired difference
(4)	C	A		C	A	
Mean	3.35	2.74	0.650	310	270	40.7
SEM	0.52	0.38	0.370	39	16	19.1
p			NS			NS
CRP (8)						
Mean	19.1	19.6	0.56	2047	2148	101
SEM	3.1	2.8	0.72	301	318	101
p			NS			NS

C: Control periods; A: Periods after amiloride administration; NS: Non significant.

15.62 ± 2.36 per cent increased to 20.52 ± 3.23 per cent (+ 4.89 ± 1.45, $p < 0.25$). The FE_K (Table 5) in control periods ranged between 69.2 per cent (patient 5) and 305.3 per cent (patient 4), with a mean value of 131.5 ± 38.0 per cent. Amiloride administration decreased it to 39.5 ± 8.3 per cent (− 104.8 ± 22.3, $p < .0025$). Fe_{Cl} (Table 5) did not change significantly. When Na excretion (Table 3) was expressed as μEq/min/100 ml GFR, control values were 1919 ± 396 and increased to 2631 ± 410 (+ 614 ± 178, $p < .01$). The control K excretion was (Table 4) 642 ± 116 and decreased to 20.8 ± 44.6 (−446.4 ± 93.5, $p < .0025$). The ratio between the Na excretion increase and K excretion decrease was 1.596 ± 0.47, $p < .01$.

Discussion

The increased Na and K excretion per nephron enables the chronic renal patients to maintain the balance of both cations even though the nephron population is substantially reduced [7, 32, 35]. In agreement with data from other laboratories, the FE_{Na} and FE_K in our patients was elevated when compared with normal subjects with similar amounts of Na and K intake. The probable mechanism which would be responsible for the shifting of the glomerulotubular balance for Na in CRF have been extensively studied [8, 39, 43].

An especially noteworthy fact in our results is the greater natriuretic effect that amiloride exerts on patients with CRF than in normal subjects. In fact, although the same doses of the diuretic were administered to renal patients the FE_{Na} was increased four times more than in normal subjects. Moreover, when urinary Na excretion is expressed in μEq/min/100 ml GFR, the mean increase in renal patients was about 6 times higher than in normal subjects, through the effect of amiloride. The fact that a greater amount of sodium may be inhibited in chronic patients by amiloride shows that absolute sodium reabsorption is increased in the distal nephron where the action of the diuretic takes place [11, 19, 31, 40]. As has been suggested, this increased reabsorption would be secondary to an increased sodium delivery to the distal segments [22, 36, 43].

The basal FE_K in CRF patients was markedly elevated, in half of the patients the urinary K excretion surpassed K filtered load, and the mean value for FE_K was five times higher than in normal subjects. As a result of this renal adaptation, plasma K concentration was normal in all patients with CRF (Table 1). The renal mechanisms of tubular K secretion are located in the late distal convoluted and cortical collecting tubules [17, 29, 30]. By microperfusion technique of both isolated segments, in rabbits, it has been possible to demonstrate that K secretion is passive in the late distal convolute tubule, secondary to the negative intraluminal potential [15] and independent of mineralo-corticoid effect [18, 19]. On the contrary in the cortical collecting tubule, K secretion would be aldosterone-dependent [18, 19]. On the other hand, the presence of an active K secretion in rabbit cortical collecting tubule has been inferred from the observation of tubular fluid K concentrations in excess of those predicted by the Nernst equation, from the measured electrical potential difference [17].

Several factors in CRF seemingly take part in the process of adaptation of K secretion by the surviving nephrons, in order to mantain K balance. The findings in chronic renal patients are similar to those observed in experimental animals with normal renal function submitted to chronic K overloads [37, 44]. K balance is maintained in CRF in spite of normal K intake. This implies that about 50 mEq per day must be handled by a kidney with 25 per cent or less of the normal nephron population. Total body K content, however, does not seem to be increased in CRF patients [16, 41]. Intracellular K content in epithelial cells of those segments which are responsible for K secretion would be an important factor [15, 44]. Although the intracellular K content in such epithelial structures is not accurately known, it has been shown that in the Amphiuma distal tubules K secretion depends not so much on total intra-

cellular K content but rather on a small fraction of it, the K transport compartment [44]. An increased activity of Na-K dependent ATPase, in the outer medulla of uremic and non uremic rats eating a high K diet, has been reported [13, 14, 37]. Distal K secretion is tubular flow rate dependent [21, 24]. In remnant nephrons of CRF, the volume of GFR that fails to be proximally reabsorbed and is delivered to distal segments, increases as the nephron population becomes reduced [8, 22, 39, 43]. This larger volume of tubular fluid that reaches the secretory segments would be one of the determinant factors of the increased FE_K. K secretion also appears to be interrelated to H secretion [6]. This relationship between K and H secretion has been interpreted as a competition for a common pathway. However, micropuncture studies in rats [27] have cast doubt on the existence of such competition. CRF is an interesting situation in which the secretion of both K and H is simultaneously stimulated in the surviving nephrons [12, 42, 46, 48].

Another factor that must be taken into account when attempting to explain the dramatic rise of the FE_K in CRF is Na delivery to K secreting segments. The critical role played by Na in distal K secretion has been born out. In rat experiments with micropuncture technique [29] it has been estimated that the amount of Na reabsorbed in distal convoluted tubule is one order of magnitude higher than the amount of K secreted, even in state of salt depletion. Notwithstanding, several experimental observations have demonstrated that an acute reduction of urinary Na excretion may sharply depress the rate of K excretion [5, 10]. Tubular Na reabsorption would be the major driving force of the progressively increasing negative transtubular potential difference that has been recorded along the distal convoluted tubule [3, 28] and cortical collecting duct [17, 18]. The entrance of Na from the lumen into the tubular cell stimulates Na extrusion through an active electrogenic mechanism located in the peritubular membrane. This Na extrusion generates the electronegative potential difference through the peritubular membrane that favors the uptake of K into the cells [15]. In turn the K uptake regulates the size of the intracellular K transport compartment [44] and the chemical gradient for K secretion into the lumen.

From the results of this work, we have been able to observe in normal subjects that amiloride administration determines a reduction in Na reabsorption (158 ± 48 μEq/min/100 ml GFR) and K secretion (-63.9 ± 4.6 μEq/min/100 ml GFR) with a ratio of about 2 : 1. In chronic renal patients, amiloride administration maintains this ratio in spite of increased Na excretion by nephron (614 ± 178 μEq/min/100 ml GFR) and K secretion (-446 ± 93.5 μEq/min/100 ml GFR). These findings enable us to set forth the hypothesis of an interdependence between opposite movements of Na and K through the tubular segments sensitive to amiloride, both in normal kidney or in the surviving nephrons in CRF. It is suprising to note that in both normal subjects and CRF patients, Cl excretion was not clearly affected by amiloride in spite of the significant increase in Na excretion. This fact would seem to indicate that the diuretic only affects Na reabsorption which could thus either be followed by another anion (for instance bicarbonate) or exchanged for K without affecting Cl reabsorption. Active Cl transport has been demonstrated in the thick ascending limb of Henle's loop [33] and also in the collecting duct [20]. If amiloride exclusively renders the channels of the luminal membrane impermeable for Na, without affecting the Cl permeability or the active Cl transport, then it would be possible to explain the scanty effect of this diuretic on urinary Cl excretion.

Amiloride reduced FE_K from 131.5 ± 38.0 per cent to 39.5 ± 8.30 in CRF patients and from 25.5 ± 5.5 per cent to 7.0 ± 0.72 per cent in normal subjects. The decrease of FE_K amounted to -104.8 ± 22.3 per cent in the former and -18.5 ± 6.2 per cent in the latter. Amiloride renders the luminal membrane impermeable to Na [4] and abolishes the negative transepithelial potential difference of distal convoluted tubule and cortical collecting duct [11, 15, 40]. Consequently, pas-

sive K transfer down an electrochemical gradient from the epithelial cell into the lumen is suppressed. K secretion still remaining in absence of an electrochemical gradient, would take place through an active mechanism, independent of Na reabsorption. An active K secretion, amiloride insensitive, was also postulated in the rat salivary duct [23] and in the cortical collecting tubule of the rabbit [17]. From these findings it can be inferred that both the amiloride sensitive and insensitive fractions of K secretion are notoriously increased in the surviving nephrons of CRF (Fig. 1). We can postulate that at the time that nephron population becomes reduced, there is a parallel increase in the size of intracellular K transport pool simultaneously with the increased activity of Na-K dependent ATPase [35] without necessarily implying enlargement of intracellular total K content. The increase in enzymatic activity might well account for the greater fraction of K secretion still remaining after tubular blockade by amiloride.

Summary

In chronic renal failure (CRF), potassium (K) tolerance depends on the ability to develop an adaptive increase in potassium secretion by the distal tubular cells of the remaining nephrons. By means of amiloride (A), it is possible to cancel passive K diffusion by distal tubules, dependent on Na reabsorption and transtubular potential difference. The K secretion that persists in the presence of A is independent of the electrochemical gradient and probably active. Administration of A (0.6 mg/kg and 0.6 mg/kg i.v.) in 4 normal subjects increased FE_{Na} % in $+ 1.33 \pm 0.36$ %, $p > 0.025$ and decreased FE_K % in $- 18.5 \pm 6.2$, $p > 0.05$; 7.00 ± 0.72 per cent of FE_K. In 8 patients with CRF the same dose of A increased FE_{Na} % $+ 4.89 \pm 1.45$ % $p > 0.025$ and decreased FE_K % in $- 104.8 \pm 22.3$, $p > 0.0025$; 39.5 ± 8.3 per cent was the FE_K that persists despite A administration being sustained. From these results we concluded that : K secretion has two mechanisms : one, A sensitive, and the other that persists despite that blocked with A. This K excretion A insensitive could be attributed to an active mechanism. Both FE_K are over-stimulated in CRF.

Resumen

Mecanismo de la secreción de potasio en la insuficiencia renal crónica: estudio por medio del amiloride.

La capacidad para mantener el balance y la concentración plasmática de potasio dentro de límites normales, aún en estadíos terminales de la insuficiencia renal crónica (IRC), es debida a un marcado aumento de la secreción de potasio por nefrón remanente. El amiloride es un diurético que inhibe la secreción de K por impermeabilizar la membrana luminal al Na y anular la diferencia de potencial transepitelial negativa intraluminal, que la reabsorción transtubular de sodio genera. La secreción de K que persiste en presencia de amiloride sería independiente del gradiente electroquímico transepitelial generado por el transporte de sodio y probablemente de naturaleza activa. En este trabajo hemos estudiado los efectos de la administración del clorhidrato de amiloride (0.6 mg/kg de peso corporal y 0.6 mg/kg/h) por infusión intravenosa en 8 pacientes con IRC (filtrado glomerular evaluado por el $C_{ITM}{}^{131}I$, inferior a 25 ml/min) y en 4 sujetos normales en igual dosis; sobre la excreción de potasio, sodio y cloro urinario. El amiloride aumentó en los sujetos normales la excreción fraccional de sodio (EF_{Na}) de 2.33 ± 0.28 a 3.41 ± 0.60 % (diferencia pareada 1.33 ± 0.36 %, $p < .025$). La del potasio (EF_K) se redujo de 25.50 ± 5.50 % a 7.00 ± 0.72 % ($- 18.5 \pm 6.2$ %, $p < .05$). En los pacientes con IRC la EF_{Na} basal fue de 15.62 ± 2.36 %, el amiloride la elevó a 20.52 % ± 3.23 (4.89 ± 1.45 %, $p < .025$). La excreción fraccional de K (EF_K) descendió de 131.5 ± 38.0 a 39.5 ± 8.3 % ($- 104.8 \pm 22.3$ %, $p < .0025$). La excreción fraccional del cloro no se modificó significativamente por la administración del diurético en ninguno de los dos grupos experimentales. De es-

tos resultados concluimos que: 1) la adaptación renal para mantener el balance de potasio que se observa en la IRC a medida que su población de nefrones se reduce obedece a un marcado aumento de la secreción de K por nefrón remanente; 2) mediante la administración de amiloride es posible diferenciar dos fracciones de la secreción tubular de K. Una fracción amiloride sensible y dependiente de la reabsorción de sodio y de la diferencia de potencial transepitelial a nivel del segmento tubular donde dicho diurético actúa, de naturaleza pasiva. Otra que persiste a pesar del bloqueo con amiloride que se segregaría independientemente de la reabsorción de sodio y de un gradiente eléctrico favorable, de naturaleza probablemente activa. Ambas fracciones de la secreción de potasio están sobrestimuladas en los pacientes con IRC con relación a los sujetos normales.

References

1. Baba WL, Lant AF, Smith AJ, Townshend MM, Wilson GM: Pharmacological effects in animals and normal human subjects of the diuretic amiloride hydrochloride (MK-870). *Clin Pharmacol Ther* 9: 318, 1968.
2. Bank N, Aynedjian HS: A micropuncture study of potassium excretion by the remnant kidney. *J Clin Invest* 52: 1480, 1973.
3. Barratt LJ, Reotor FO (Jr), Kokko JP, Tisher CC, Seldin DW: Transepithelial potential difference profile of the distal tubule of the rat kidney. *Kidney Int* 8: 368, 1975.
4. Bentley PJ: Amiloride: a potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. *J Physiol (Lond)* 195: 317, 1968.
5. Berliner RW, Kennedy TJ (Jr), Hilton JG: Renal mechanisms for excretion of potassium. *Am J Physiol* 162: 348, 1950.
6. Berliner RW, Kennedy TJ (Jr), Orloff J: Relationship between acidification of the urine and potassium metabolism. *Am J Med* 11: 274, 1951.
7. Berlyne GM: Exchangeable potassium and renal potassium handling in advanced chronic renal failure. *Nephron* 8: 264, 1971.
8. Bricker NS, Klahr S, Lubowitz H, Rieselbach RS: Renal function in chronic renal disease. *Medicine (Balt)*, 44: 263, 1965.
9. Burg M, Stoner L: Sodium transport in the distal nephron. *Fed Proceed* 33: 31, 1974.
10. Davidson DG, Levinsky NG, Berliner RW: Maintenance of potassium excretion despite reduction of glomerular filtration during sodium diuresis. *J Clin Invest* 37: 548, 1958.
11. Duarte CG, Chomety F, Giebich G: Effect of amiloride, ouabain, and furosemide on distal tubular function in the rat. *Am J Physiol* 221: 632, 1971.
12. Elkington JR: Hydrogen ion turnover in health and in renal disease. *Ann Int Med* 57: 660, 1962.
13. Epstein FH: Critical role of the renal papilla in potassium adaptation: effect of papilectomy in the isolated perfused kidney. *Clin Res* 23: 374, 1975.
14. Finkelnstein FO, Hayslett JP: Role of medullary structures in the functional adaptation of renal insufficiency. *Kidney Inter* 6: 419, 1974.
15. Giebisch G: Some reflections on the mechanism of renal tubulus potassium transport. *Yale J Biol Med* 48: 315, 1975.
16. Graham JA, Lawson DH, Linton AL: Muscle biopsy water and electrolyte contents in chronic renal failure. *Clin Sci* 38: 583, 1970.
17. Grantham JJ, Burg MB, Orloff J: The nature of transtubular Na and K transport in isolated rabbit renal collecting tubules. *J Clin Invest* 49: 1815, 1970.
18. Gross JB, Imai M, Kokko JP: A functional comparison of the cortical collecting tubule and the distal convoluted tubule. *J Clin Invest* 55: 1284, 1975.
19. Gross JB, Kokko JP: Effects of aldosterone and potassium-sparing diuretics on electrical potential difference across the distal nephron. *J Clin Invest* 59: 82, 1977.
20. Jacobson HR, Gross JB, Kawamura S, Waters JD, Kokko JP: Electrophysiological studies of isolated perfused human collecting ducts. Ion dependency of the transepithelial potential difference. *J Clin Invest* 58: 1233, 1976.
21. Khuri RN. Widerholt M, Streider N, Giebisch G: The effects of flow rate and potassium intake on distal tubular potassium transfer. *Am J Physiol* 228: 1249, 1975.
22. Kleeman CR, Adams DA, Maxwell MH: An evaluation of maximal water diuresis in chronic renal disease. I. Normal solute intake. *J Lab Clin Med* 58: 169, 1961.
23. Kanuf H, Lübcke R: Evidence of Na independent active secretion of K and HCO_3 by rat salivary duct epithelium. *Pflüg Archiv* 361: 55, 1975.
24. Kunau RT (Jr), Webb HL, Borman SC: Characteristics of the relationship between the flow rate of tubular fluid and potassium transport in the distal tubule of the rat. *J Clin Invest* 54: 1488, 1974.
25. Kunau RT (Jr), Whinnery MA: Potassium transfer in distal tubules of normal and remnant kidneys. *Am J Physiol* 235: F186, 1978.
26. Maher FT, Nolan NG, Elveback LR: Comparison of simultaneous clearances of ^{125}I-labeled sodium iothalamate (Glofil) and Inulin. *Mayo Clin Proceed* 46: 690, 1971.
27. Malnic G, Mello-Aires M de, Giebisch G: Potassium transport across renal distal tu-

bules during acid-base disturbances. *Am J Physiol* 221: 1192, 1971.
28. Malnic G, Giebisch G: Some electrical properties of distal tubular epithelium in the rat. *Am J Physiol* 223: 797, 1972.
29. Malnic G, Klose RM, Giebisch G: Microperfusion study of distal tubular potassium and sodium transport in rat nephron. *Am J Physiol* 211: 529, 1966.
30. Malnic G, Klose RM, Giebisch G: Micropuncture study or renal potassium excretion in the rat. *Am J Physiol* 206: 647, 1964.
31. Meng K: Comparison of the local effects of Amiloride Hydrochloride on the Isotonic fluid absorption in the distal and proximal convoluted tubule. *Pflügers Arch* 357: 91, 1975.
32. Platt R: Sodium and potassium excretion in chronic renal failure. *Clin Sci* 9: 367, 1950.
33. Rocha AS, Kokko JP: Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of Henle. Evidence for active chloride transport. *J Clin Invest* 52: 612, 1973.
34. Schon DA, Silva P, Hayslett JP: Mechanism of potassium excretion in renal insufficiency. *Am J Physiol* 227: 1323, 1974.
35. Schultze R, Taggart DD, Shapiro H, Pennell JP, Caglar S, Bricker NS: On the adaptation in potassium excretion associated with nephron reduction in the dog. *J Clin Invest* 50: 1061, 1971.
36. Schultze RG, Weisser F, Bricker BS: The influence of uremia on fractional sodium reabsorption by the proximal tubule in rats. *Kidney Int* 2: 59, 1972.
37. Silva P, Hayslett JP, Epstein FH: Chronic K adaptation: role of Na-K ATPasa. *J Clin Invest* 52: 2065, 1973.
38. Silva P, Brown RS, Epstein F: Adaptation to potassium. *Kidney Int* 11: 466, 1977.
39. Slatopolsky E, Elkan IO, Weerts C, Bricker NS: Studies on the characteristics of the control system governing sodium excretion in uremic man. *J Clin Invest* 47: 521, 1968.
40. Stoner L, Burg M, Orloff J: Ion transport in cortical collecting tubule: effect of amiloride. *Am J Physiol* 227: 453, 1974.
41. Villamil MF, Yeyati NL, Rubianes C, Taquini AC: Water and electrolyte of muscle in chronic renal failure. *Acta Physiol Lat Am* 13: 184, 1963.
42. Villamil MF, Yeyati NL, Enero MA, Alvarez CCP, Taquini AC: Renal excretion of hydrogen ion in chronic renal failure. *Helvetica Med Acta* 1: 53, 1962.
43. Villamil MF, Riva I de la, Yeyati NL, Enero MA, Taquini AC: Solute excretion in chronic renal failure. *Proceed Ist Internat Congress Nephrol* (Geneve), Evian, 592 pp, 1961.
44. Wiederholt M, Sullivan WJ, Giebisch G, Solomon AK, Curran PF: Potassium and sodium transport across single distal tubules of Amphiuma. *J Gen Physiol* 57: 495, 1971.
45. Wright FS, Strieder N, Fowler HB, Giebish G: Potassium secretion by the distal tubule after potassium adaptation. *Am J Physiol* 221: 437, 1971.
46. Wrong O, Davies HEF: The excretion of acid in renal disease. *Quart J Med* 28: 259, 1959.
47. Yeyati NL, Pertzov G, Fontana GP, Barrera E, Gotlieb D: Efectos del amiloride sobre los movimientos transtubulares del potasio. *Medicina (Bs Aires)* 36: 545, 1976.
48. Yeyati NL, Garrahan P, Villamil MF: Effect of calcium on the renal excretion of hydrogen ion in chronic renal failure. *Proceed 2nd Int Congr Nephrol* (Prague), 814 pp, 1963.
49. Yeyati NL, Pertzov G, Prigollini D, Barrera L, Gotlieb D: Mechanism of K (Potassium) secretion in CRF (Chronic Renal Failure) studied by means of Amiloride. *VIIth International Congress of Nephrology*, Montreal, Canada, June 1978.

— — — —

A Life Filled with Toil and Work is not a Burden but a Blessing.

Una vida hecha de trabajo y esfuerzo no es un peso sino una bendición.

RUDOLF VIRCHOW (1821-1902)

Dedicatoria de su Tesis de doctorado, según M. M. Wintrobe en *Blood, pure and eloquent: A story of people and of ideas.* McGraw-Hill, 1980

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 439-445 (1981)

ESTUDIO DEL HIGADO CON MICROSCOPIA DE LUZ Y ELECTRONICA EN PACIENTES TUBERCULOSOS QUE RECIBEN RIFAMPICINA E ISONIACIDA

J. A. PILHEU, MARIA C. DE SALVO, O. KOCH, J. A. BARCAT

Hospital E. Tornú e Instituto de Patología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Los avances en la quimioterapia antituberculosa permiten una mayor eficacia y una reducción en la duración del tratamiento. La intensa acción bactericida de la rifampicina (R) y de la isoniacida (I) constituye la base de estos buenos resultados. En un pequeño número de casos el empleo de estas dos drogas suele producir reacciones adversas entre las cuales las hepáticas han merecido la atención de diversos autores [3, 5, 10]. Para tratar de aclarar esta situación hemos estudiado el hígado, con microscopía de luz y electrónica, en un grupo de pacientes tuberculosos que recibían R e I, primero en forma aislada y luego, asociadas.

Material y métodos

Se estudió un grupo de 21 pacientes con tuberculosis pulmonar activa, con buen estado general, sin antecedentes de alcoholismo ni de enfermedades hepáticas, con una edad media de 24.2 años (rango 16-43), hospitalizados. Los pacientes eran vírgenes de tratamiento antituberculoso y no recibieron ninguna medicación durante los 5 días previos al estudio. Las biopsias hepáticas se realizaron con la técnica de Menghini, y todos los pacientes tenían un tiempo de protrombina superior al 60 %. Los pacientes se agruparon así:

Grupo R. 11 casos. Recibieron R, 10 mg/kg de peso, diariamente, durante 15 días. De los 11 casos, a 7 de ellos se les efectuó un estudio del hígado con microscopía de luz antes de recibir R y a los 15 días de ser tratados con esa droga. En los otros 4 pacientes se estudió el hígado con microscopía electrónica antes de recibir R y a los 15 días de haberla recibido.

Grupo I. 9 casos. Recibieron I, 5 mg/kg de peso, diariamente, durante 15 días. De los 9 casos, se estudió el hígado en 7 casos con microscopía de luz y en 2 casos, con microscopía electrónica, antes y a los 15 días de recibir I.

Grupo RI. 14 casos (pertenecientes a los Grupos R e I). Recibieron R o I los primeros 15 días y continuaron luego su tratamiento con R e I, con las mismas dosis, diariamente. A 11 de ellos se les efectuó un estudio hepático con microscopía de luz antes de la quimioterapia, a los 15 días de recibir R o I y a los 3 meses del tratamiento asociado. En los otros 3 pacientes se estudió el hígado con microscopía electrónica antes de la quimioterapia y a los 3 meses de recibir R e I.

El material para microscopía de luz se coloreó con hematoxilina-eosina, técnica para retículo y tricrómico de Masson. Las alteraciones halladas se describieron siguiendo a Scheuer [12] y se cuantificaron como en un trabajo anterior [10]. Para el estudio electrónico se fijó la biopsia hepática en glutaraldehido al 3 % en buffer de cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.3); posteriormente fue post-fijado en tetróxido de osmio al 1 % (fijador de Caulfield). Luego de deshidratado se incluyó en Epon 812. Se efectuaron cortes ultrafinos con un ultramicrótomo Porter Blum modelo MT-1. Los preparados fueron coloreados con acetato de uranilo y citrato de plomo y observados en

— — — —

Recibido: 2-III-1981. Aceptado: 17-VI-1981.

Dirección postal: Hospital Tornú, Donato Alvarez 3000, 1427 Buenos Aires, Argentina.

un microscopio electrónico Siemens Elmiskop 1 A.
Tests funcionales hepáticos: Antes de la quimioterapia se efectuaron dosajes séricos de transaminasa glutámico-pirúvica (TGP), de fosfatasa alcalina y de bilirrubina. Estos dosajes se repitieron a los 15 días de recibir drogas y luego, una vez por mes, hasta la finalización del tratamiento antituberculoso.

Resultados

Microscopía de luz (Tabla 1)

Grupo R. De los 7 pacientes, todos presentaron una biopsia inicial normal. A los 15 días, un caso presentó una necrosis focal (+) y los demás fueron normales.

Grupo I. Del total de los 7 enfermos, la biopsia inicial mostró un hígado normal en 6 casos y necrosis focal (+) en un caso. A los 15 días, el hígado era normal en 6 casos, incluyendo el que tenía necrosis focal previa; en un caso apareció transformación grasa (++) y necrosis focal (++).

Grupo RI. De los 11 casos examinados al final de los 3 meses de recibir R e I, persistía la necrosis focal (+) en el paciente del Grupo R que la había presentado a los 15 días; los otros 10 eran normales.

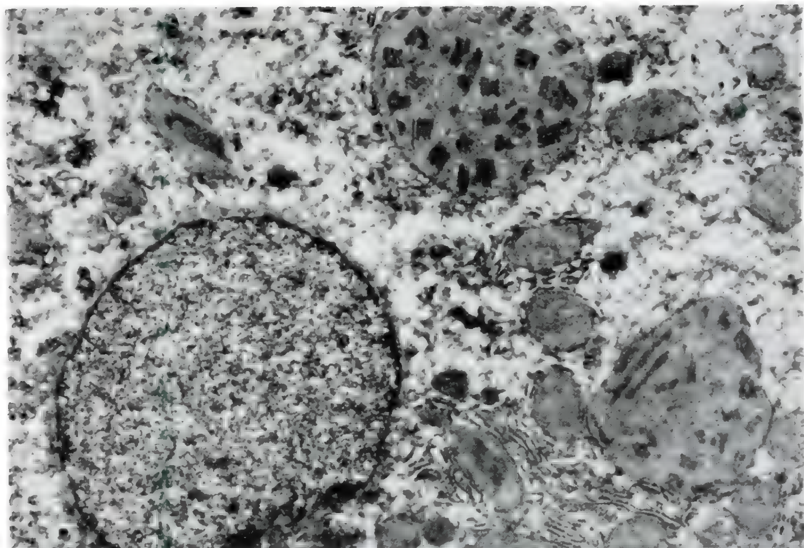
Microscopía electrónica (Tabla 2)

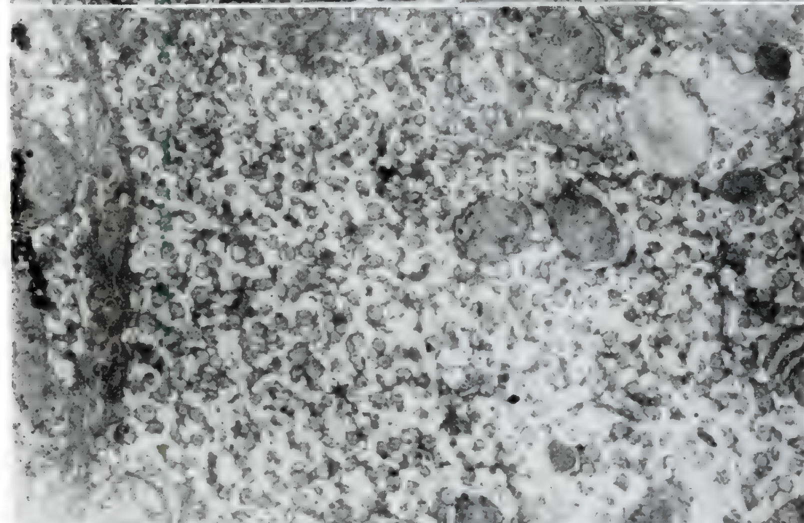
Grupo R. En los 5 pacientes de este grupo la biopsia inicial fue normal. A los 15 días de recibir R se efectuó la segunda biopsia sólo en 4. En 3 se observaron alteraciones mitocondriales (Fig. 1). Estas consistieron en cambios conformacionales con agrandamiento de las organelas que, en uno de los casos, llegó hasta la formación de estructuras gigantes (megamitocondrias), de un tamaño superior a las 4 micras. En estas megamitocondrias, así como en numerosas mitocondrias de tamaño normal o ligeramente aumentado, fue posible visualizar numerosos cuerpos paracristalinos libres en la matriz mitocondrial. El número de crestas estuvo en general disminuido. En uno de los casos las alteraciones mitocondriales se acompañaron de una discreta hiperplasia del retículo endoplásmico agranular. En el caso restante, sin anormalidades mitocondriales, había una hiperplasia moderada del retículo endoplásmico.

Grupo I. En los 3 casos estudiados la biopsia previa fue normal. A los 15 días de recibir I se pudo repetir la biopsia en 2 casos: en los 2 había una hiperplasia moderada del retículo endoplásmico agranular, con vesiculización (Fig. 2); en uno

TABLA 1. — *Microscopía óptica. Resultados de las biopsias hepáticas efectuadas antes de la quimioterapia, a los 15 días y a los 3 meses de recibir rifampicina (R) o isoniacida (I)*

Nº	Droga recibida	Biopsia hepática: Previa	A los 15 días	A los 3 meses
1	R	Normal	Necrosis focal (+)	Necrosis focal (+)
2	R	,,	Normal	Normal
3	R	,,	,,	,,
4	R	,,	,,	,,
5	R	,,	,,	,,
6	R	,,	,,	,,
7	R	,,	,,	,,
8	I	Necrosis focal	,,	,,
9	I	Normal	,,	,,
10	I	,,	Transformación grasa (++) + necrosis focal (++)	,,
11	I	,,	Normal	,,
12	I	,,	,,	—
13	I	,,	,,	—
14	I	,,	,,	—


1


2

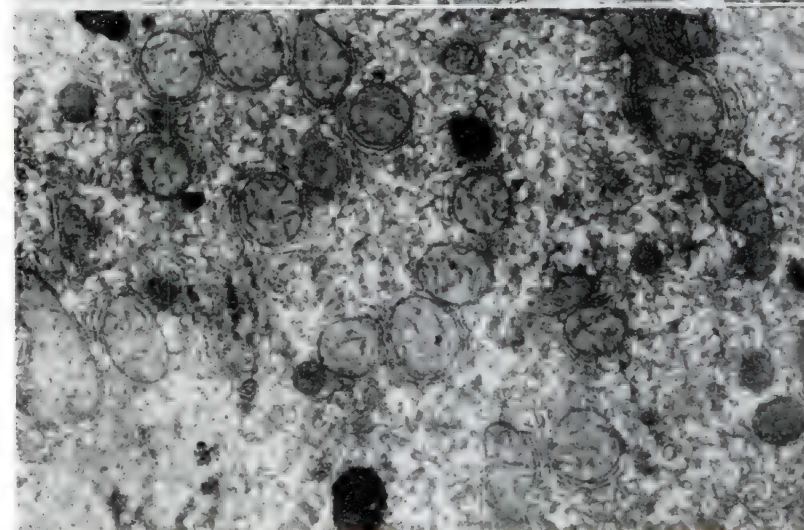

3

Fig. 1. — Ultraestructura hepática de un paciente tratado con rifampicina durante 15 días. Se observa un marcado agrandamiento mitocondrial con formación de megamitocondrias. Numerosos cuerpos paracristalinos se encuentran libres en la matriz mitocondrial. Acetato de uranilo - citrato de ploxo. X 8 500.

Fig. 2. — Hiperplasia del REA con vesiculización en un paciente tratado con isoniacida durante 15 días. Acetato de uranilo - citrato de plomo. X 10 500.

Fig. 3. — Discreta hiperplasia del REA en un enfermo tratado con rifampicina + isoniacida durante 3 meses. Acetato de uranilo - citrato de plomo. X 10 500.

TABLA 2. — *Microscopía electrónica. Resultados de las biopsias hepáticas efectuadas antes de la quimioterapia, a los 15 días de recibir rifampicina (R) o isoniacida (I) solas y a los 3 de recibir R + I.*

Nº	Droga inicial	Biopsia hepática		
		Previa	A los 15 días	A los 3 meses de R + I
1	R	Normal	Alteraciones mitocondriales e hiperplasia del REA	—
2	R	,,	Alteraciones mitocondriales	—
3	R	,,	Alteraciones mitocondriales	—
4	R	,,	Hiperplasia del REA	—
5	R	,,	—	Normal
6	I	,,	Hiperplasia del REA	Leve hiperplasia del REA
7	I	,,	—	Normal
8	I	,,	Hiperplasia del REA y vesiculización	—

Abreviaturas: R, Rifampicina; I, Isoniacida; REA, retículo endoplásmico agranular.

de los casos había también discreta desagregación de ribosomas.

Grupo RI. En los 3 pacientes de este Grupo (uno del Grupo R y dos del Grupo I) la biopsia previa fue normal. A los 3 meses de recibir R e I, dos casos eran normales y el tercero presentaba una leve hiperplasia del retículo endoplásmico (Fig. 3), que ya había sido observada en la segunda biopsia hecha a los 15 días de recibir I sola.

Tests funcionales hepáticos. En los pacientes del Grupo R no se observaron alteraciones séricas previas ni durante la quimioterapia. En el Grupo I, un paciente presentó TGP aumentada dos veces el valor normal antes del tratamiento y se normalizó al primer mes. Los pacientes del Grupo RI no presentaron modificaciones séricas.

Discusión

Los esquemas antituberculosos suelen producir, en un número reducido de pacientes, manifestaciones hepáticas más o menos severas. Como se emplean siempre asociaciones de 3 ó 4 drogas, no resulta fácil determinar cuál es la droga responsable. Ante la aparición de manifestaciones clínicas o bioquímicas, la suspensión de todo el tratamiento, seguida del suministro de cada una de las drogas por separado una vez normalizada la situación hepática, aclara muchas veces la incógnita. La mejor manera de evaluar la acción de un medicamento es darlo solo, y para conocer su repercusión sobre el hígado, estudiar éste previamente y después de un lapso de tratamiento. Es lo que hemos hecho para la R y la I; el lapso de suministro ha sido de 15 días, período suficiente para conocer el comportamiento del hígado y que no puede prolongarse por el riesgo que significa la aparición de resistencia bacteriana en el enfermo tuberculoso que recibe una sola droga. Estudiamos la repercusión de la asociación R + I a lo largo de 3 meses, tiempo que consideramos suficiente para observar alteraciones hepáticas.

La microscopía de luz, a los 15 días de recibir R o I, demostró la existencia de alteraciones mínimas en un caso de cada Grupo, sin modificaciones bioquímicas ni síntomas clínicos concomitantes. Por otra parte, un caso con necrosis focal antes de recibir I era normal a los 15 días de recibirla. Los pacientes en quienes efectuamos un estudio histológico hepático a los 3 meses de ser tratados con R + I

(11 casos) mostraron una ausencia de alteraciones hepáticas, con la excepción de un paciente en quien persistía una discreta necrosis focal que ya había sido observada a los 15 días de recibir R; este paciente tampoco presentó síntomas clínicos ni modificaciones bioquímicas. Estos hechos concuerdan con la experiencia clínica. En efecto, los pacientes tuberculosos sin antecedentes de enfermedades hepáticas ni de alcoholismo raramente presentan efectos colaterales hepáticos atribuibles a las drogas antituberculosas. La situación puede ser diferente cuando hay antecedentes clínicos de compromiso hepático. Solamente en estos pacientes, o en aquellos con antecedentes dudosos, está justificado efectuar tests hepáticos durante la quimioterapia, y ante la aparición de manifestaciones clínicas o bioquímicas, se impone un estudio completo para aclarar la causa de dichas manifestaciones [3].

El estudio con microscopía electrónica mostró que la alteración más significativa en los pacientes tratados con R son las anormalidades mitocondriales. Alteraciones similares han sido descriptas en quienes reciben anticonceptivos por períodos prolongados [8], así como en algunas hepatopatías, fundamentalmente la hepatitis alcohólica [7, 11]. El significado funcional de esta alteración no se puede extraer de la simple observación microscópica. Sin embargo, su reproducción en animales de laboratorio ha permitido extraer interesantes conclusiones. Tal vez la fundamental sería que bajo la misma imagen ultraestructural (megamitocondria) se presentan diversas modificaciones bioquímicas que difieren marcadamente de acuerdo al tipo de noxa que produjo la alteración. Así, en el alcoholismo crónico [6] o luego del tratamiento con altas dosis de cloramfenicol [4] las megamitocondrias se acompañan de una marcada reducción de su actividad funcional (actividad respiratoria máxima), con un descenso de la actividad de la citocromo-oxidasa y en el contenido de los citocromos b y a-a3. Luego del tratamiento con estrógenos y progestágenos solamente se observa una franca reducción de la actividad de la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa [2]. En cambio, en las mitocondrias por intoxicación con cuprizona no existen alteraciones en la actividad respiratoria máxima. La presencia de inclusiones paracristalinas dentro de la matriz mitocondrial es de más difícil interpretación. Estas formaciones son presumiblemente proteínas de alto peso molecular que contienen algunos fosfolípidos. Han sido descriptas en una gran variedad de enfermedades hepáticas, como también en sujetos sanos [1]. Las alteraciones mitocondriales descriptas, atribuidas a la R, y que observamos a los 15 días de suministrar esa droga, no las encontramos a los 3 meses del tratamiento con R + 1, si bien los enfermos que estudiamos no fueron los mismos en ambas circunstancias. La hiperplasia del retículo endoplásmico que observamos en dos de los casos tratados con R 15 días, en dos tratados con I 15 días y en uno a los 3 meses de recibir R e I, es similar a la vista luego del tratamiento con diversas drogas e indica una hiperactividad funcional adaptativa, con aumento de las enzimas microsomales encargadas de la detoxificación hepática [9].

Estos resultados confirman lo que observamos en un estudio anterior [10], en el que fueron evaluadas las alteraciones hepáticas antes y a los 3 meses de tratar enfermos tuberculosos con esquemas que contenían I, R e I + R. En pocos casos comprobamos la aparición de alteraciones hepáticas durante la quimioterapia y esas alteraciones eran mínimas y no se acompañaban de modificaciones bioquímicas. Por otro lado, muchas de las lesiones halladas antes de la quimioterapia habían desaparecido al tercer mes. El haber empleado en este estudio ambas drogas en forma aislada y luego en forma asociada y con un examen microscópico de luz y electrónico del hígado, nos aclara la acción de cada una de ellas a corto plazo y de ambas a lo largo de 3 meses.

Sugerimos, de acuerdo a las conclusiones de este estudio, no persistir en considerar a la R y a la I como drogas hepatotóxicas, pues las modificaciones hepáticas que producen son mínimas y sin repercusión clínica. Sólo en casos excepcionales estas drogas producirían daño hepático por un mecanismo de injuria idiosincrásica [13] en individuos inusualmente susceptibles.

Resumen

Con el objeto de evaluar la acción de la rifampicina (R) y de la isoniacida (I) sobre el hígado, se suministraron estas drogas, durante 15 días, en forma aislada, a dos grupos de pacientes tuberculosos (Grupo R y Grupo I). Algunos pacientes continuaron recibiendo R + I, asociadas, durante 3 meses (Grupo RI). Se estudió el hígado mediante biopsias, con microscopía de luz y electrónica, y tests funcionales. Las biopsias fueron hechas antes de recibir las drogas, a los 15 días de recibir R o I, y a los 3 meses de recibir R + I; los tests funcionales se efectuaron al inicio y luego, una vez por mes.

La microscopía de luz mostró, a los 15 días de recibir R o I, alteraciones hepáticas mínimas en un caso de cada grupo, sin modificaciones bioquímicas. Un caso con necrosis focal inicial se normalizó a los 15 días de recibir I. A los 3 meses de ser tratados con R + I, sólo un caso presentó una necrosis focal, sin modificaciones bioquímicas. En microscopía electrónica se observó que, a los 15 días de recibir R, había alteraciones mitocondriales (megamitocondrias) cuya presencia ha sido descripta en las hepatitis alcohólicas y por el uso de anticonceptivos, y cuyo significado funcional no es fácil de determinar. Análoga opinión merecen las inclusiones paracristalinas que se comprobaron en la matriz mitocondrial. En cuanto a la hiperplasia del retículo endoplásmico observada, tanto después de recibir 15 días de R o de I, y en un caso después de 3 meses de R + I, indica una hiperactividad funcional de tipo adaptativo, con aumento de las zonas microsomales encargadas de la detoxificación hepática. Evaluando los resultados obtenidos se admite que, en los enfermos tuberculosos no alcoholistas y sin antecedentes de enfermedad hepática, las alteraciones observadas en el hígado después de recibir R, I o R-I, son de escasa repercusión funcional y probablemente reversibles aun continuando el tratamiento con las mismas drogas.

Summary

LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPICAL STUDIES OF THE LIVER OF TUBERCULOUS PATIENTS RECEIVING RIFAMPICIN AND ISONIAZID.

The functional and morphological changes produced in the liver by rifampicin (R) and isoniazid (I), alone or combined, were studied in a group of patients with active pulmonary tuberculosis. Patients were 16 to 43 years old, with no history of hepatic disease or alcoholism. Eleven patients received R alone, 10 mg per kg daily, during 15 days (Group R). Nine patients received I alone, 10 mg per kg, daily, during 15 days (Group I). Fourteen patients previously treated either with R or I continued treatment with both these drugs during 3 months (Group RI). A liver biopsy was performed before starting chemotherapy, after 15 days of treatment either with R or I, and after 3 months of treatment with R and I. Serum bilirrubin, alkaline phosphatase, and glutamic piruvic transaminase were measured before treatment, after 15 days, and afterwards monthly. Liver biopsies were studied by light and electron microscopy. The liver of 7 patients of Group R were studied with light microscopy, all were normal before starting chemotherapy; after 15 days one showed focal necrosis, the others remained normal. Electron microscopy was done in 5 patients before beginning chemotherapy, all were normal; after 15 days, 4 were studied, and 3 showed enlargement of mitochondria (megamitochondria), and paracrystalline inclusions in the mitochondrial matrix (Fig. 1). One of these cases and a remaining one, had a slight hyperplasia of the endoplasmic reticulum. In Group I, the liver of 7 patients was studied by light microscopy; in one, focal necrosis was found before starting treatment, the others were normal; after 15 days, fatty changes and focal necrosis appeared in one patient who had a normal liver before treatment. Electron microscopy was done out in 2 patients before treatment, both were normal; after 15 days, both of them showed a moderate hyperplasia of the smooth endoplasmic reticulum with vesiculation

(Fig. 2). The liver of 11 patients of Group RI was studied by light microscopy; in one patient the focal necrosis found after 15 days of treatment with R persisted, the other 10 were normal. Electron microscopy of the liver was done in 3 patients of this group; in one, a slight hyperplasia of the endoplasmic reticulum was found (Fig. 3), after treatment with I alone. The serum glutamic piruvic transaminase level in one patient of Group I was twice the normal value before treatment and returned to normal after a month; this was the only patient with abnormal serum findings. Light microscopy findings were similar to those found in patients treated with various antituberculous regimens including Rand I. Ultrastructural changes such as enlargement of mitochondria (megamitochondria) were similar to those found in alcoholics and in women taking oral contraceptives. Endoplasmic reticulum hyperplasia and vesiculation are thought to be an adaptative change related to liver detoxification. Paracrystalline mitochondrial inclusions were like those seen in some hepatic diseases, and sometimes even in normal livers. These morphological alterations were of no clinical significance. Therefore, these observations support the hypothesis that the mechanism of injury, in the cases of adverse reactions to rifampicin and isoniazid, is one of idiosyncratic hepatotoxicity.

Bibliografía

1. Bhagwat AG, Ross RC: Hepatic intramitochondrial crystalloids. *Arch Pathol* 91: 70, 1971.
2. Brignone J, Campos de Brignone C, Gamboni M, Koch OR, Stoppani AOM: Alteraciones mitocondriales hepáticas en la rata por tratamiento con anovulatorios orales. *Medicina (Bs. Aires)* 38: 413, 1978.
3. Dutt A, Stead W: Chemotherapy of tuberculosis for the 1980's. Clinics in Chest Medicine, Saunders Co, Philadelphia, 1980.
4. Junqueira VBC, García de Dávila MT, Koch OR, Boveris A: Morphological and functional changes of chloramphenicol-induced megamitochondria in liver of mice. *Rev Micr Electr Biol Cel* 6: 115, 1979.
5. Girling DJ: The hepatic toxicity of antituberculous regimens containing isoniazid, rifampicin and pyrazinamide. *Tubercle* 59: 13, 1978.
6. Koch OR, Boveris A, Stoppani AOM: Mitochondrial injury in experimental chronic alcoholism. *In:* Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems. Enzymology and Subcellular Organelles. (Eds) R. G. Thurman, J. R. Williamson, H. R. Drott, B. Chance. Academic Press, New York, 1977, p 441.
7. Koch OR, García Fernández JC, Marchezotti A, Vasquez S, Fellner J: Ultraestructura del hígado en alcoholistas crónicos. *Prensa Méd Arg* 61: 981, 1974.
8. Pérez V, Gorodisch S, Martire J, Di Paola G: Oral contraceptives: Long term use produces fine structural changes in liver mitochondria. *Science* 165: 805, 1969.
9. Pérez V, Schaffner F, Popper H: Hepatic drug reaction. *In:* Progress in liver disease. Vol IV. (Eds) H. Popper, F. Schaffner. Grune & Stratton, New York, 1972, p 597.
10. Pilheu JA, De Salvo MC, Barcat JA: Acción de los esquemas con Isoniacida y Rifampicina sobre el hígado de enfermos tuberculosos. *Medicina (Bs Aires)* 39: 298, 1979.
11. Porta EA, Bergman BJ, Stein AA: Acute alcoholic hepatitis. *Am J Pathol* 46: 657, 1965.
12. Scheuer PJ: Liver Biopsy Interpretation, 3rd edn., Bailliere Tindall, London, 1980, pp 245 & 88.
13. Zimmerman HJ, Ishak KG: Hepatic injury due to drugs and toxins. *In:* Pathology of the Liver, (Eds) MacSween, R N. M, Anthony P. P., Scheuer P. J., Churchill Livingstone, Edinburgh, 1980, p 335.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 446-452 (1981)

EFFECT OF DIETARY PROTEIN ON HEPATIC HANDLING OF SULFOBROMOPHTHALEIN [1]

J. V. RODRIGUEZ *, MARIA C. CARRILLO *, LIDA S. MORISOLI **, E. A. RODRIGUEZ GARAY ***

Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional de Rosario

The hepatic handling of Sulfobromophthalein (BSP) involves at least four different steps: 1) translocation of BSP from plasma to liver cell across the sinusoidal membrane; 2) intracellular binding to cytoplasmic proteins; 3) conjugation with Glutathione, and 4) translocation of BSP mainly in the conjugated form into bile [5, 10, 11, 22, 27]. It was reported that intrahepatic conjugation of BSP with Glutathione exerts an important effect on dye excretion into bile [6]. On the other hand it was suggested that factors affecting delivery from liver cells into bile are selectively impaired by feeding a protein-free diet [3] and that impaired intrahepatic conjugation of BSP results in a decreased rate of biliary excretion of dye [28]. Thus, it was suggested that conjugation of BSP may be the rate limiting step in the over-all transport of dye from blood to bile [22]. It was also described that rats fed a protein-free diet exhibited significant plasma dye retention and a diminished bile flow [17]. In previous investigations [23] we suggested that impaired BSP transfer from plasma to liver observed in rats fed a protein-free diet, might be due to a diminished liver uptake of dye. In this investigation we examined severals steps of BSP hepatic transport in rats fed a complete diet and a protein-free diet, in order to give insight into the mechanism responsible for the impairment produced by the latter and the participation of bile flow in the process of BSP transfer into bile.

Received: 26-XII-1980. Accepted: 11-III-1981.

[1] Presented at the XXV Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mendoza, November 1980.

* Fellow of CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Member of Research Career, Consejo de Investigaciones, Universidad Nacional de Rosario.

*** Member of Research Career, CONICET.

Postal address: Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas, Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina.

Material and methods

Male Wistar rats weighing about 150 g were housed in groups of three in wire-bottomed stainless steel cages in a room with a 6 A.M. to 6 P.M. light cycle. After prefeeding with a normal synthetic diet, rats weighing 250 g were divided into two groups. As control, a group of rats on the normal diet was used. Other groups of rats, were fed a synthetic protein-free diet for 7 days, and then used.

The synthetic normal diet consisted of the following: 27 % casein, 59 % corn starch, 10 % corn oil, 4 % Jones & Foster salt mixture [15]. The protein-free diet consisted of: 70 % corn starch,

15 % alphacel, 10 % corn oil, 4 % salt mixture, 1 % cod liver oil.

Normal and protein-free diet were supplemented with a vitamin mixture (1.5 g/kg choline chloride, 1.0 g/kg inositol, 20 mg/kg calcium pantothenate, 15 mg/kg niacin, 3 mg/kg riboflavin, 2.5 mg/kg pyridoxine hydrochloride, 2.0 mg/kg thiamine hydrochloride, 2.0 mg/kg p-aminobenzoic acid, 2.0 mg/kg menadione, 2.0 mg/kg folic acid, 0.2 mg/kg biotin). Both diets were shown to be isocaloric (4.5 kcal/g). Food and water were given *ad libitum*.

Experimental procedures

Polyethylene catheters (PE-50, Intramedic, USA) were inserted into the bile duct, a femoral vein and a femoral artery, under ether anesthesia. Then, the animals were placed in restraining cages and remained conscious throughout the experiment. A solution of 0.9 % NaCl was infused through the venous catheter at a rate of 0.5 ml/h. Body temperature during the experiment was maintained by placing the rats into a warm thermostatically controlled chamber.

The animals were divided into four groups: I) rats on a normal diet; II) rats on a normal diet that received BSP; III) rats on a protein-free diet, and IV) rats on a protein-free diet that received BSP.

Ninety minutes after surgery, collection of bile was started. This time interval was necessary to allow recovery from ether anesthesia. Previous experiments in our laboratory (unpublished) showed that bile flow decreased by ether anesthesia [4], was recovered after the mentioned time interval to reach constant values.

Rats of groups II and IV received a single dose of BSP i.v. (4.8 μmoles/100 g body weight, dissolved in 1 ml 0.9 % NaCl solution), prior to bile collection. In these rats, plasma disappearance rate of BSP was also calculated. Arterial blood samples were taken at 1, 2, 3 and 4 minutes after the injection of dye. The first order rate constant K_1 was calculated by least squares method [7].

Bile was collected in all the groups every 10 minutes for two hours. At the end of bile collection, blood was extracted by heart puncture, the liver perfused with cold saline, and then removed, gently blotted on filter paper, and weighed. The ratio liver weight/body weight was calculated. To minimize possible diurnal variations the rats were routinely killed between 9:30 and 10:30 A.M.

Analyses

The bile flow was determined gravimetrically. BSP concentration in plasma and bile samples were determined colorimetrically after alkalination with 0.1 N NaOH, in a spectrophotometer (Arolab Mk 1, Argentina) set at 580 nm.

Total proteins concentration was determined in liver homogenates by the method of Lowry et al [20]. Determination of total glutathione (GSH) content of liver homogenates prepared in cold 5 % (w/v) Trichloroacetic acid in 0.01 N HCl, was carried out as described by Tietze [25]. GSH-s-transferase activity of 105 000 g liver supernatant (Spinco Model L Ultracentrifuge, USA) was measured by using two different substrates (1-Chloro-2.4-dinitrobenzene and BSP) [9, 13], in separate determinations. (DB-Beckman spectrophotometer, USA).

Chromatographic studies

Bile samples collected during the first hour were concentrated to a small volume [21] and then applied to Whatman 3 MM paper. BSP and its metabolites were separated by ascending chromatography using as solvent system butanol-acetic acid-water (40 : 10 : 20) [14]. The relative amounts of free and conjugated BSP were estimated by densitometry (Densicord 542 A, Photovolt, USA) after spraying the chromatogram with 5 % (w/v) KOH ethanol solution [24]. Appropriate standards of GSH-BSP and Cys-BSP were prepared as described [6, 12].

Chemicals

All the reagents employed were of high analytical grade, BSP, GSH, Cysteine, 5,5' —dithiobis— (2-nitrobenzoic acid), yeast GSH reductase, NA DPH and 1-chloro-2,4 dinitrobenzene were obtained from Sigma Chemical Co. USA.

Results

Effect of protein-free diet on body weight, liver weight and total hepatic proteins

Body weight loss after seven days of protein-free diet administration averaged 9.0 % (S.E. ± 0.38) of the initial weight. On the contrary body weight was increased in rats on the normal diet after a similar time period (7.3 %, S.E. ± 2.23), a value similar to that reported by some authors [16].

Liver weight and the ratio liver weight/body weight were also diminished in protein deficient rats. Total hepatic proteins concentration was decreased in rats fed the protein-free diet. The results are presented in Table 1.

Hepatic GSH content and GSH-s-transferase activity

Hepatic GSH was markedly diminished in rats on the protein-free diet (Table 2).

GSH-s-transferase activity when expressed per g of liver was also significantly lower for both substrates. However, the

TABLE 1. — *Body weight, liver weight and total hepatic proteins in rats fed a normal or a protein-free diet*

	Body weight (g)	Liver weight (g)	$\left(\frac{\text{Liver wt.}}{\text{Body wt.}}\right) 100$	Total hepatic protein (mg/g liver)
Normal diet n : 8	284 ± 13	8.9 ± 0.4	3.13 ± 0.11	175 ± 7
		$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.02$
Protein-free diet n : 8	269 ± 7	6.9 ± 0.2	2.56 ± 0.09	144 ± 5

TABLA 2. — *Glutathione content of liver in rats fed a normal or a protein-free diet and the effect of BSP injection on the hepatic Glutathione*

Group	n	GSH μg/g liver
I	3	1108 ± 11 *
II	3	811 ± 104
III	3	474 ± 15 *
IV	3	385 ± 22

* $p < 0.01$.

specific activity of the enzyme suffered no variations on account of diet (Table 3).

Rate of disappearance from plasma of BSP

The rate of disappearance from plasma of BSP estimated by the first order rate constant K_1 was significantly lower in rats on the protein-free diet. K_1 values for these animals averaged 0.184 (S.E. ± 0.03, n : 4) as compared to the values observed in rats on the normal diet (0.250, S.E. ± 0.05, n : 4) ($p < 0.02$).

Rate of BSP biliary excretion

The rate of BSP biliary excretion is shown in Figure 1. It can be seen that the highest rate of biliary excretion was reached after 20 minutes of the injection in both groups of rats. However, the excretion rate was significantly lower in in protein-deficient rats (0.49 μmoles/10 min/100 g b.wt, S.E. ± 0.04, n : 4) as compared to that of rats fed the complete diet (0.90 μmoles/10 min/100 g b.wt, S.E. ± 0.04, n : 4) ($p < 0.001$).

Percent dose recovery after 60 minutes of bile collection was also significantly lower in rats on the protein-free diet (42.2 %, S.E. ± 3.4, n : 4) as compared to that observed in rats on the normal diet (53.1 %, S.E. ± 4.7, n : 4) ($p < 0.05$).

TABLE 3. — *GSH-s-transferase activity in livers of rats fed a normal or a protein-free diet*

	CDNB a μmoles/min/g liver	BSP b mg/5 min/g liver	CDNB a nmoles/min/g protein	BSP b mg/5 min/g protein
Normal diet n : 4	59.2 ± 2.5	11.8 ± 0.7	1228 ± 29	196 ± 19
	$p < 0.01$	$p < 0.01$		
Protein-free diet n : 4	44.2 ± 3.3	7.1 ± 0.8	1225 ± 61	188 ± 29

a Activity measured at 25°C and pH : 6.5 using 1 mM 1-chloro-2,4-dinitro benzene and 1 mM GSH in a final volume of 2 ml of reaction mixture [13]; b Activity measured at 37° C and pH : 8 using BSP (1 μmol) and GSH (93 μmoles) in a final volume of 4.4 ml of reaction mixture [9].

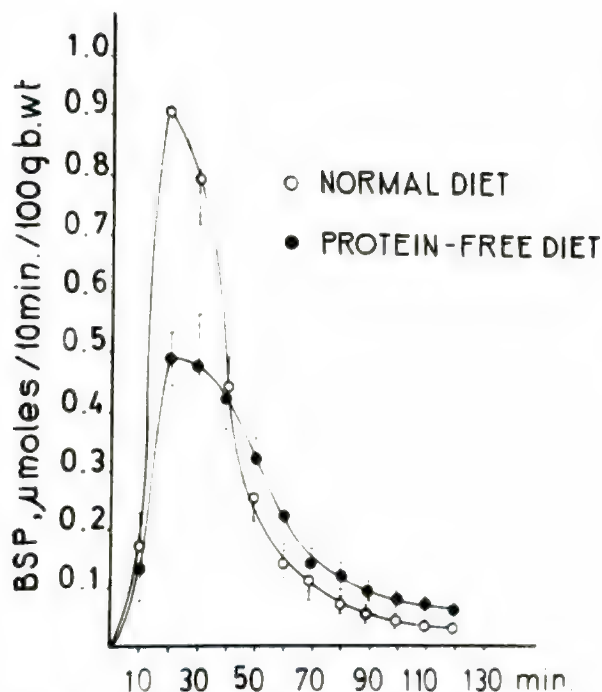


Fig. 1. — Sulfobromophthalein (BSP) biliary excretion in rats fed a normal or a protein-free diet.

Chromatographic studies

The chromatograms revealed the presence of free BSP, cysteinilglycine-BSP, cysteine-BSP, and a fourth metabolite unidentified [29]. Time course of biliary excretion of free BSP and total conjugates during the first hour of bile collection following the injection of dye, is shown in Figure 2.

Since there were no differences between groups in the relative amounts of conjugated BSP (normal diet: 58.2 %, S.E. ± 2.0, n : 4; protein-free diet: 53.9 %, S.E. ± 3.8, n : 4), decreased rate of BSP biliary excretion observed in protein-deficient rats was at the expense of both free and conjugated BSP.

Bile flow

Mean bile flow did not show differences between both groups (normal diet:

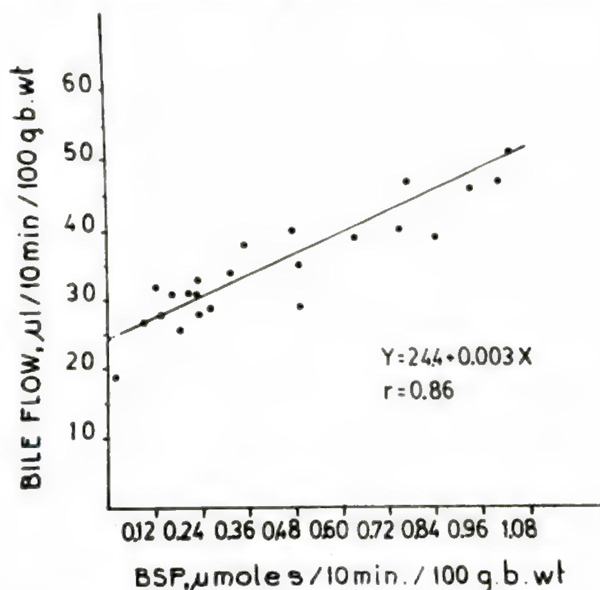


Fig. 3. — Relationship between bile flow and Sulfobromophthalein (BSP) biliary excretion in rats fed a normal diet.

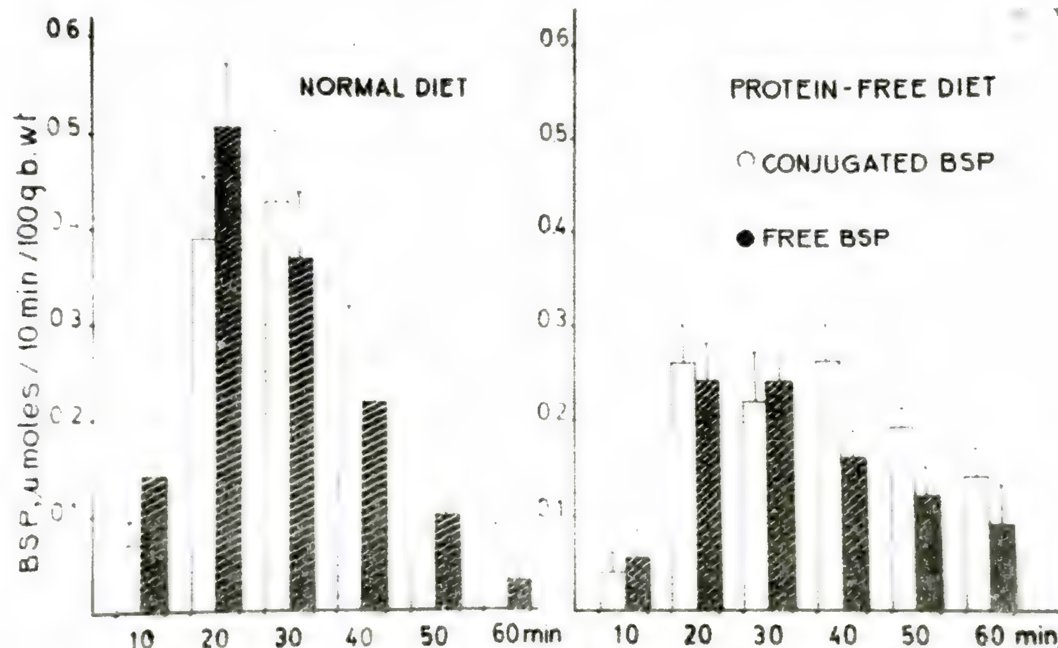


Fig. 2. — Time course of free and conjugated Sulfobromophthalein (BSP) biliary excretion in rats fed a normal or a protein-free diet.

3.3 μl/min/100 g b.wt, S.E. ± 0.19, n : 4; protein-free diet: 2.6 μl/min/100 g b.wt, S.E. ± 0.12, n : 4).

However, in rats on the normal diet an increase of bile flow was observed in coincidence with the peak of BSP biliary excretion, and a direct relationship was obtained between both parameters (Fig. 3). Such a phenomenon was not observed in rats fed the protein-free diet.

Discussion

It has been reported that protein deprivation in rats resulted in an impaired excretion of BSP into bile due to a defect of BSP conjugation [3]. In accordance with that conclusion, BSP conjugation may be a limitant step in the transfer of dye between plasma and bile [6].

The role of ligandin, a hepatic cytoplasmic protein involved in the uptake of organic anions, has been recently reexamined [25]. Thus, it was suggested that the binding of organic anions to ligandin prevents their efflux to plasma, regulating in this way the liver uptake of these compounds. On the other hand, carrier proteins located at the plasma membrane of the hepatocyte, are involved in the hepatic uptake of BSP [26]. Furthermore, bile flow may be an important determinant of the liver capacity for BSP excretion [18]. In this sense, it was recently proved that bile flow and bilirubin conjugation were both depressed by ether anesthesia, commonly used by most investigators [8]. Moreover, it has been described by using pentobarbital anesthesia, that rats fed a protein-free diet exhibited a diminished bile flow [17]. Thus, the mechanisms involved in the hepatic transfer of BSP by rats deprived of protein are rather complex.

The results described in this paper revealed a diminished activity of hepatic GSH-s-transferase in protein-deprived rats. Since GSH-s-transferase other than transferase B bind organic anions [1] and GSH-s-transferase B (identified as ligandin) represents about 80 % of all GSH-s-transferase in rat liver [2], our findings are in agreement with a diminished concentration of cytoplasmic proteins involved in the uptake of dye. This was supported by the slower rate of disappearance of BSP from plasma observed in rats fed a protein-free diet. A diminished activity of GSH-s-transferase may be nonspecific phenomenon related to a decrease of hepatic total proteins, as described in this paper. However, it is not possible to discard that carrier proteins of the plasma membrane are at least in part involved in the process.

The role of bile flow deserves special attention. Since a direct relationship between bile and the rate of BSP excretion into bile was proved, we can assume that BSP contributes to bile production. Such a contribution was not observed in rats fed a protein-free diet probably due to a significant reduction of BSP biliary excretion. It was described that high doses of BSP diminished bile flow [18] but experimental conditions and anesthesia must be considered before reaching a final conclusion.

In summary, the experiments described in this paper suggested that the impaired hepatic transfer of BSP observed in protein-deprived rats, may be a consequence of a low concentration of cytoplasmic protein available for BSP binding. This may result in a higher efflux of dye to plasma resulting in a slower rate of removal from the circulation and in a lower amount of intracellular BSP available for hepatic conjugation and biliary excretion. However, it is not possible to arrive at a definite conclusion and probably more than one step of BSP hepatic transport may be impaired by dietary protein deficiency.

Summary

Transfer of Sulfobromophthalein (BSP) from plasma into bile was studied in rats fed a normal or a protein-free diet. Bile was collected in all the rats after recovery from ether anesthesia. Some animals from both groups received a single injection of BSP intravenously, and then collection of bile was started for determination of bile flow. The initial rate of di-

sappearance of BSP from plasma (calculated by the first order rate constant K_1) and the rate of biliary excretion of BSP, was also determined in these rats. Chromatographic studies allowed the estimation of the relative amounts of free and conjugated BSP present in bile samples. Body weight, liver weight, total hepatic proteins, hepatic glutathione, and hepatic glutathione-s-transferase, were determined in all the animals. Rats on a protein-free diet exhibited a weight loss, a diminished liver weight/body weight ratio, and a lower K_1 and rate of BSP biliary excretion. Hepatic glutathione and glutathione-s-transferase were also decreased. The results favor the conclusion that deprivation of protein resulted in an impairment of the hepatic transfer of BSP from plasma into bile, probably due to a defect in the mechanism involved in the hepatic uptake of dye.

Resumen

EFECTO DE LA DIETA APROTEICA SOBRE EL TRANSPORTE HEPÁTICO DE SULFOBROMOFTALEÍNA.

Se estudió el transporte hepático de sulfobromoftaleína (BSP) desde el plasma a la bilis, en ratas alimentadas con dieta normal o carente de proteínas. La dieta normal fue reemplazada por la dieta aprotir del destete hasta los setenta días, en que en una parte de los animales, la dieta normal fue reemplazada por la dieta aproteica que fue mantenida durante 7 días. En todas las ratas se recogió bilis después de la recuperación de la anestesia etérea, a fin de determinar el flujo biliar. Una parte de los animales recibió una dosis única de BSP por vía intravenosa, determinándose la velocidad de desaparición plasmática del colorante (mediante la estimación de la constante K_1 calculada por el método de los mínimos cuadrados) y la velocidad de excreción biliar del mismo. Además, estudios cromatográficos permitieron calcular los porcentajes de BSF libre y conjugada presentes en bilis. En todas las ratas se determinó el peso corporal, el peso del hígado, la concentración de proteínas hepáticas totales, el glutatión hepático y la actividad glutatión-s-transferasa hepática. Los resultados obtenidos, permitieron establecer que por efecto de la dieta aproteica, se produjo una pérdida de peso corporal, una disminución de la relación peso hígado/peso corporal, del K_1 y de la velocidad de excreción biliar de BSP. También se observó una marcada disminución del glutatión hepático y de la actividad glutatión-s-transferasa del hígado. Además, en las ratas alimentadas con la dieta normal, se comprobó una correlación positiva y significativa entre flujo biliar y velocidad de excreción biliar de BSP. Los resultados obtenidos, permitieron suponer que por efecto de la dieta aproteica, se produce una alteración del transporte hepático de BSP, probablemente a expensas de los mecanismos involucrados en la captación hepática del colorante.

Acknowledgments: This work was supported in part by grants from the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Programa EFIHER, CONICET). The authors thank Drs. S. Revelli and L. Pascual (Departamento de Fisicoquímica, Fac. Cs. Bioquímicas, U.N.R.) for calorimetric studies, and Mr. Raúl Trbojevich for valuable technical assistance.

References

1. Arias IM, Jakoby WB: *In:* Glutathione: Metabolism and Function, Raven Press, New York, 1976, p 304.
2. Arias IM: Ligandin: Review and update of a multifunctional protein. *Medical Biology* 57: 328, 1979.
3. Berke R, Combes B: The effect of dietary protein on hepatic BSP removal mechanisms. *Clin Res* 13: 63, 1965. (Abstract.)
4. Blanckaert N, Compernolle F, Leroy P, Van Houtte R, Fevery J, Heirwegh KPM: The fate of Bilirubin-IX glucuronide in cholestasis and during storage in vitro. *Biochem J* 171: 203, 1978.
5. Brauer RW, Pessotti RL: Hepatic uptake and biliary excretion of Bromosulphalein in the dog. *Am J Physiol* 162: 565, 1950.
6. Combes B: The importance of conjugation with Glutathione for Sulfobromophthalein Sodium (BSP) transfer from blood to bile. *J Clin Invest* 44: 1214, 1965.
7. Fauvert RE: The concept of hepatic clearance. *Gastroenterology* 37: 603, 1959.
8. Fevery J: Thesis. Leuven Univ, 1972.
9. Goldstein J, Combes B: Spectrophotometric assay of the liver enzyme that catalyzes

Sulfobromophthalein-Glutathione conjugation. *J Lab & Clin Med* 67: 863, 1966.
10. Goresky C: The hepatic uptake and excretion of Sulfobromophthalein and Bilirubin. *Can Med Assoc J* 92: 851, 1965.
11. Grodsky GM, Carbone JV, Fanska R: Metabolism of Sulfobromophthalein *Nature* 4659: 469, 1959.
12. Grodsky GM, Carbone JV, Fanska R: Identification of metabolites of Sulfobromophthalein. *J Clin Invest* 38: 1981, 1959.
13. Habig W, Pabst MJ, Jakoby W: Glutathione-s-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130, 1974.
14. Javitt NB, Wheeler HO, Baker KL, Ramos OL: The intrahepatic conjugation of Sulfobromophthalein and Glutathione in the dog. *J Clin Invest* 39: 1570, 1960.
15. Jones JH, Foster C: A salt mixture for use with basal diets either low or high in phosphorus. *J Nutr* 24: 245, 1942.
16. Kawano S, Hiraga K: Effect of dietary protein deficiency on rat hepatic drug-metabolizing enzyme system. *Japan J Pharmacol* 30: 75, 1980.
17. Klaasen CD, Plaa GL: Hepatic disposition of Phenoldibromophthalein disulfonate and Sulfobromophthalein. *Am J Physiol* 215: 971, 1968.
18. Klaassen CD: Biliary excretion of drugs: Role of liganding in newborn immaturity and in the action of microsomal enzyme inducers. *J Pharmacol Exptl Ther* 195: 311, 1975.
19. Klaassen CD: Plasma disappearance and biliary excretion of Sulfobromophthalein and Phenol-3-6-dibromophthalein disulfonate after microsomal enzyme induction. *Biochem Pharmacol* 19: 1241, 1970.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265, 1951.
21. Noir B, Rodríguez Garay EA, Royer M: Separation and properties of conjugated Biliverdin. *Biochem Biophys Acta* 100: 403, 1965.
22. Philp JR, Grodsky GM, Carbone JV: Mercaptide conjugation in the uptake and secretion of Sulfobromophthalein. *Am J Physiol* 200: 545, 1961.
23. Rodríguez Garay EA, Morisoli LS, Spetale MR, Rassero JA: Efecto de la dieta aproteica sobre el transporte hepático de Bromosulfaleína. *Acta Physiol Lat Amer* 25: 197, 1975.
24. Rodríguez Garay EA, Pérez V, Royer M: Fluorometric determination of free and conjugated Bromosulphalein (BAP) in experimental liver injury. *Acta Physiol Lat Amer* 27: 68, 1967.
25. Tietze F: Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized Glutahione. *Ann Biochem* 27: 502, 1969.
26. Tiribelli C, Lunazzi G, Luciani M, Panfili E, Gazzin B, Lint G, Sandri G, Sottocasa G: Isolation of a Sulfobromophthalein-binding protein from hepatocyte plasma miembrane. *Biochem Biophys Acta* 532: 105, 1978.
27. Whelan G, Hoch J, Combes B: A direct assessment of the importance of the conjugation for biliary transport of Sulfobromophthalein Sodium. *J Lab & Clin Med* 75: 542, 1970.
28. Whelan G, Hoch J, Combes B: Biliary excretion of conjugated Sulfobromophthalein Sodium (BSP) in rats fed a protein-free diet. *Proc Soc Exp Biol Med* 132: 704, 1969.
29. Whelan G, Plaa GL: The application of thin layer chromatography to Sulfobromophthalein metabolism studies. *Toxicol Applied Pharmacol* 5: 457, 1963.

– – – –

If you are not willing to learn and unlearn all your life through, you should give up Medicine and take up a third-rate trade.

Si no está dispuesto a aprender y desaprender durante toda su vida, debería abandonar la Medicina y dedicarse a un oficio de tercera categoría.

LORD JOSEPH LISTER (1827-1912)

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 453-458 (1981)

COLESTEROL EN LAS FRACCIONES LIPOPROTEICAS EN MUJERES OBESAS NORMOLIPEMICAS CON O SIN DISMINUCION DE LA TOLERANCIA GLUCIDA *

GRACIELA R. CASTRO, B. NUSIMOVICH, STEFANIA HERBST, MYRIAM A. DE RODI, N. O. MOCCHIUTTI, YOLANDA B. DE LOMBARDO **

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral y Servicio de Endocrinología y Metabolismo del Hospital J. B. Iturraspe, Santa Fe

Los altos niveles de colesterol plasmático son considerados como el mayor factor de riesgo de enfermedad cardiovascular. Aun cuando está bien establecido que la enfermedad es multifactorial en su origen, la prevención primaria y secundaria de las formas clínicas de aterosclerosis ha estado dirigida hasta hace muy poco tiempo hacia la disminución de los niveles elevados de colesterol. El descubrimiento de que el colesterol sanguíneo total está compuesto por una parte aterogénica constituida por el colesterol de las fracciones β y pre-β lipoproteínas; y una parte protectora, antiaterogénica o colesterol de la fracción α lipoproteica ha modificado sustancialmente aquellos conceptos. Diversos estudios epidemiológicos [5, 10, 15, 17] han indicado que el nivel de colesterol de la fracción α es el mejor pronóstico de enfermedad coronaria y que constituye un factor anti-riesgo independiente, ya que un alto nivel actuaría como protector contra la enfermedad cardiovascular. El mecanismo de acción de la α lipoproteína no es aun completamente conocido, pero se han discutido varias posibilidades: puede interferir en la captación del colesterol de la fracción β por las células endoteliales —activa la lipólisis a través de uno de sus componentes apoproteicos— la Apo C_{II}, y aparece involucrada en la remoción del colesterol desde los tejidos periféricos al hígado donde es catabolizado y excretado. Cobra importancia, entonces, determinar no sólo los lípidos séricos totales sino también los componentes de las lipoproteínas, ya que pueden existir anormalidades en las diferentes fracciones lipoproteicas aun cuando los niveles de lípidos séricos totales sean normales. Rossner [18], por ejemplo, encuentra niveles de colesterol sérico normal pero bajos niveles de colesterol en la fracción α en pacientes con enfermedad cerebrovascular. El objeto de nuestro trabajo fue estudiar el contenido de colesterol en las distintas fracciones lipoproteicas en mujeres obesas con o sin alteraciones del metabolismo hidrocarbonado, todas ellas consideradas normolipémicas de acuerdo a los exámenes convencionales de lípidos plasmáticos.

Recibido: 10-X-1980. Aceptado: 27-III-1981.

* Parte de los datos experimentales fueron presentados en las 2ª Jornadas Argentinas de Diabetes, Rosario, agosto 1980.

** Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Dirección postal: Departamento de Ciencias Biológicas, Santiago del Estero 2829, 3000 Santa Fe, Argentina.

Material y métodos

Se estudiaron 92 pacientes mujeres con edades comprendidas entre 17 y 63 años, provenientes del Servicio de Endocrinología y Metabolismo del Hospital J. B. Iturraspe, de Santa Fe. Todas ellas fueron clasificadas como normolipémicas de acuerdo a la recomendación de la WHO[2] y el criterio del Programa de la Clínica de Investigaciones en Lípidos del NIH[14]. Los pacientes eran ambulatorios, eutiroideos y no recibían insulina, agentes hipoglucemiantes, anticonceptivos u otras drogas que pudieran alterar los niveles lipídicos. A todas ellas se les practicó un test oral de tolerancia a la glucosa (75 gramos de glucosa en solución acuosa al 20 % P/V[11] y en muestras de ayunas (12-14 horas) se determinó triglicéridos (12) ácido úrico, (6) colesterol total, (13) colesterol de la fracción α lipoproteica (precipitación con Cl_2 Mg-heparina) (14); colesterol de la fracción β lipoproteica (precipitación con dodecil sulfato de sodio) (23), cuantificándose el colesterol en los sobrenadantes según el mismo método utilizado para el dosaje de colesterol total (13). El colesterol de la fracción pre-β lipoproteica se obtuvo por diferencia del total.

Según las edades fueron divididas en menores de 40 años (grupo A, edad promedio: 26 años, rango 17-38 años) y mayores de 40 años (grupo B, edad promedio: 50 años, rango 43 a 65 años). En este último grupo el 80 % de las pacientes eran mayores de 47 años. De acuerdo al índice ponderal[*] [7] y al resultado del test de tolerancia utilizando el criterio de Keen, H. y col.[11], las pacientes fueron agrupadas en controles, obesas con tolerancia normal (Ob. Tol. N.) y obesas con tolerancia glúcida disminuida (Ob. Tol. Gl. Dism.). Todas las pacientes comprendidas en este estudio desarrollaban una actividad física moderada (ama de casa). El anamnesis alimentario reveló pacientes no fumadoras y con un consumo mínimo de alcohol ($\leqslant$ 50 dl por día).

El análisis estadístico fue realizado con las técnicas convencionales y las diferencias entre grupos detectadas con el t-test[19].

Resultados

La Tabla 1 muestra los niveles de triglocéridos totales, colesterol total y colesterol de las fracciones α y β lipoproteicas. En la misma podemos observar una disminución del colesterol de la fracción α estadísticamente significativo en relación a los controles para las pacientes obesas con tolerancia glúcida disminuida del grupo A ($p < 0.05$) y del grupo B ($p < 0.001$).

Por otro lado las obesas con tolerancia glucídica normal muestran un decrecimiento en el contenido de colesterol de dicha fracción, pero éste no es significativo cuando se lo compara con sus respectivos controles. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores del índice ponderal de las pacientes obesas tolerancia normal y obesas tolerancia glúcida disminuida de ambos grupos.

En la Figura 1 se grafican los cocientes colesterol total/colesterol fracción α y colesterol fracción α/colesterol fracción β + colesterol fracción pre-β. En la misma podemos constatar una disminución significativa del cociente colesterol fracción α /colesterol fracción β + colesterol fracción pre-β para los pacientes obesos menores de 40 años con tolerancia glucídica normal (0.38 ± 0.02; $p < 0.01$) y para los obesos con tolerancia glúcida disminuida (0.30 ± 0.02; $p < 0.001$) en relación a los controles (0.47 ± 0.03); y un descenso similar para el grupo de pacientes obesos con tolerancia glúcida disminuida mayores de 40 años: 0.26 ± 0.02 vs 0.36 ± 0.02 ($p < 0.001$).

La relación colesterol total/colesterol fracción α evidencia un incremento en los obesos con tolerancia glúcida disminuida del grupo A, alcanzando valores de 4.33 ± 0.22 frente a 3.30 ± 0.14 del grupo control ($p < 0.001$) y para el grupo B se eleva a 5.03 ± 0.38 en relación a su control correspondiente: 3.86 ± 0.12 ($p < 0.001$).

Discusión

Nuestros resultados muestran una disminución de los niveles de colesterol en la fracción α lipoproteica (α-LP) en las mujeres obesas con tolerancia normal, decrecimiento que se vuelve muy significativo para las obesas con disminución de la tolerancia glúcida. Este hallazgo es de suma importancia, sobre todo teniendo en cuenta las conclusiones del estudio de Tromso[15], según las cuales una baja

---

$$^{*}\ IP = \frac{\text{Altura (pulgadas)}}{\sqrt[3]{\text{Peso (libras)}}}; \quad \leqslant 11.7 \text{ obeso}; \ > 11.7 < 13.3 \text{ normal}; \ \geqslant 13.3 \text{ delgado}$$

TABLA 1. — *Niveles de triglicéridos, colesterol total y de colesterol en las fracciones α y β lipoproteicas*

A

	n	I.P. Pulg / Lb 1/3	Triglicéridos mg/dl	Colesterol mg/dl	Colesterol Fracción α mg/dl	Colesterol Fracción β mg/dl
Controles	19	12.4 ± 0.1	88.2 ± 6.1	176.3 ± 6.0	56.4 ± 2.1	109.5 ± 6.0
Obesos Tolerancia normal	28	10.8 ± 0.2	90.0 ± 6.3	188.4 ± 5.5	49.0 ± 1.5 ns	115.3 ± 5.2 ns
Obesos Tolerancia glúcida disminuida	8	10.6 ± 0.3	110.1 ± 11.5 ns	203.0 ± 9.1 ns	47.5 ± 3.6 x	136.4 ± 8.0 xxx

B

	n	I.P. Pulg / Lb 1/3	Triglicéridos mg/dl	Colesterol mg/dl	Colesterol Fracción α mg/dl	Colesterol Fracción β mg/dl
Controles	11	12.2 ± 0.2	108.1 ± 9.1	223.3 ± 7.5	59.5 ± 3.0	145.5 ± 3.3
Obesos Tolerancia normal	17	10.9 ± 0.2	94.0 ± 8.1	216.2 ± 9.1	54.3 ± 2.6 ns	137.0 ± 7.5 ns
Obesos Tolerancia glúcida disminuida	7	10.4 ± 0.4	116.0 ± 10.3	204.0 ± 11.4	41.6 ± 3.0 xxx	140.4 ± 9.8 ns

I.P., índice ponderal; media + SEM; x, $p < 0.05$; xxx, $p < 0.001$, en relación al control respectivo.

concentración de colesterol en la fracción α-LP es tres veces más predictiva de enfermedades coronarias que los niveles elevados de colesterol de la fracción β lipoproteica (β-LP), o de colesterol total. Debemos destacar, no obstante, que ni aun la presencia de altos niveles de colesterol en la fracción α-LP pueden proteger al paciente si la concentración de β-LP es anormalmente alta [25].

El descenso de colesterol en la fracción α puede estar relacionado con una deficiencia de lipoproteína lipasa y con la concomitante reducción en la velocidad de desaparición del plasma de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Recientemente, ha sido demostrado que el nivel de colesterol α-LP está en estrecha relación con la actividad lipoproteína lipasa de tejido adiposo [16]. Las bases bioquímicas de esta relación se encuentran probablemente en el hecho de que parte de la α-lipoproteína plasmática, principalmente la α 2, es producida por la transferencia de colesterol, fosfolípidos y apoproteínas desde las lipoproteínas ricas en triglicéridos a la α-lipoproteína durante la degradación de aquéllas por la lipoproteína lipasa. De este modo, los bajos niveles de colesterol α-LP observados en los pacientes diabéticos, podrían explicarse por la disminución de la actividad de la lipoproteína lipasa endotelial sensible a la insulina [20].

El análisis de los cocientes colesterol fracción α/colesterol fracción β + colesterol fracción pre-β —fracción protectora sobre la suma de las fracciones aterogénicas— mostró diferencias estadísticamente significativas para las pacientes obesas menores de 40 años, siendo aun mayor esta significación para las pacientes obe-

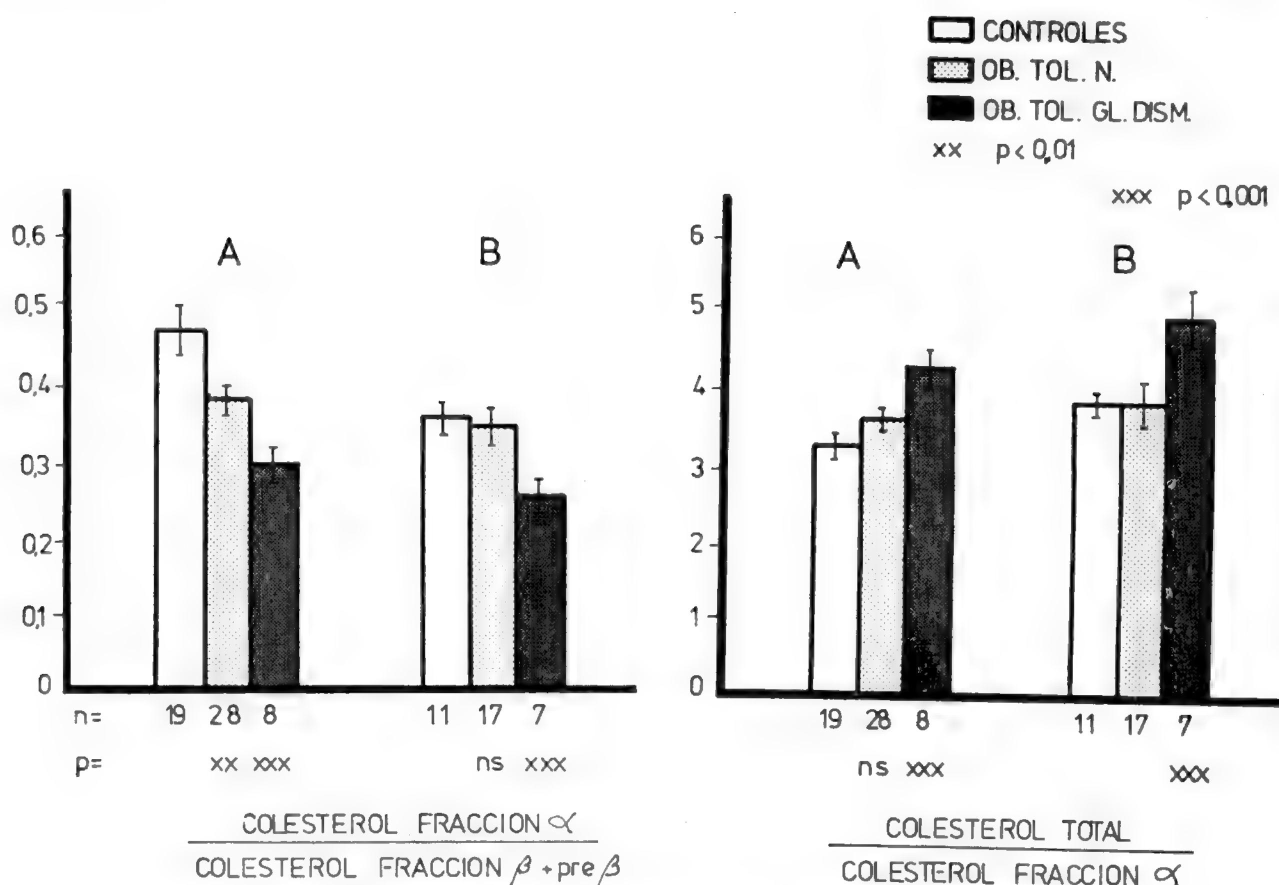


Fig. 1. — Coeficiente entre el colesterol de las fracciones lipoproteicas.

sas con disminución de la tolerancia glúcida de ambos grupos. El estudio de Framingham [5] demostró que el incremento de la relación colesterol total/colesterol fracción α, es uno de los más importantes factores de riesgo de aterosclerosis, y Williams y col. [22] sugieren que este índice debe ser incluido en todos los estudios sobre este tema. Por otro lado, Bouissou y col. [3] encuentran una estrecha relación entre dicho cociente y el dosaje de colesterol cutáneo, aun cuando la estructura histológica de la piel sea todavía normal; estando el contenido de colesterol cutáneo relacionado con el grado de envejecimiento arterial y de ateromatosis.

Varios autores han descripto valores bajos de colesterol de la fracción α-LP en pacientes obesos [4, 17, 26]; pero es conocida la asociación de una actividad física disminuida con la obesidad, estando, por otro lado, demostrada la relación de una buena actividad física con los niveles elevados de colesterol en la fracción α-LP; es imposible establecer si la obesidad *per se* o factores asociados a ella, tales como la actividad física disminuida, son los responsables de los bajos niveles de colesterol de la fracción α-LP. Los pocos estudios que evalúan el efecto de la pérdida del exceso de peso sobre los niveles del colesterol de la fracción α-LP arrojan resultados dispares. Wilson y Lees [24] demostraron un aumento del colesterol de la fracción α-LP en 6 hombres hiperlipémicos después de la disminución de peso. Hulley [8] en un programa anual de control de factores de riesgo encuentra un ligero incremento. Recientemente, Thompson [21] describe una disminución del colesterol de la fracción α-LP asociado a la pérdida de peso y, simultáneamente, Avogaro [1] presenta resultados opuestos.

Queda demostrado el interés que presenta la cuantificación de los lípidos en las fracciones lipoproteicas que nos permite detectar anomalías tempranas, en este caso especial en mujeres con tolerancia glúcida disminuida, en las que otros autores [9] han encontrado una incidencia de enfermedad cardiovascular tres veces superior a la de las que no presentan alteraciones glucídicas.

Resumen

De acuerdo al índice ponderal y al resultado de la prueba de tolerancia a la glucosa, 92 mujeres normolipémicas fueron clasificadas en controles; obesas con tolerancia normal y obesas con disminución de la tolerancia glúcida. Según las edades, se agruparon en menores (A) y mayores (B) de 40 años. Se cuantificó el contenido de colesterol (C) en las fracciones lipoproteicas —aisladas por precipitación con polianiones— y se realizaron los cocientes $C_T/C\ \alpha$ y $C\ \alpha\ /C\ \beta$ + Cpre-β considerados índices más precisos del riesgo de enfermedad coronaria isquémica. Se encontró una disminución significativa del $C\ \alpha$ en las obesas con disminución de la tolerancia glúcida frente a los controles. El cociente $C\ \alpha\ /C\ \beta$ + Cpre-β mostró un comportamiento similar y para A y B, respectivamente. La relación $C_T/C\ \alpha$ incrementó con una significación $p < 0.001$ para ambos grupos. En los obesos con tolerancia normal sólo se encontró modificación en el cociente $C\ \alpha\ /C\ \beta$ + Cpre-β para A. Nuestros resultados demuestran una alteración en la distribución del colesterol entre los distintos grupos de pacientes obesas clasificadas como normolipémicas, particularmente acentuada en las que tienen disminución de la tolerancia glúcida.

Summary

CHOLESTEROL LEVELS IN LIPOPROTEIN FRACTIONS OF OBESE NORMOLIPEMIC WOMEN WITH AND WITHOUT GLUCOSE INTOLERANCE.

High level of plasma cholesterol is considered to be a major risk factor in coronary atherosclerosis. However, only in the last few years the importance of high density lipoprotein cholesterol (HDL-Ch) as a "protective" factor against coronary heart disease has been taken into account, despite the earlier recognition that HDL-Ch was associated with a low risk of the disease. Therefore, it is important to quantify cholesterol levels in plasma of both high density (HDL) and low density lipoproteins (LDL). On the other hand, diabetes and obesity play an important role in coronary atherosclerosis. The goal of this work was to study the levels of HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and the very low density lipoprotein-cholesterol (VLDL-Ch) in a group of 90 normolipemic women, many of them obese. The patients were divided in two groups according to their age: younger (group A) and older (group B) than 40 years. Each group was subdivided in three subgroups: control, obese with normal glucose tolerance and obese with glucose intolerance.

HDL-Ch and LDL-Ch were measured after precipitation with polyanions ($MgCl_2$ - Heparin), and sodium dodecyl sulphate, respectively. Total plasma cholesterol and the levels of cholesterol in HDL, and LDL were measured by the Leffler spectrometric method. VLDL-Ch was calculated by difference from the total cholesterol. Our results showed a significant ($p < 0.05$ and < 0.001) lower level of HDL-Ch in both groups (A and B) of obese women with glucose intolerance. The obese women with normal glucose tolerance also showed lower levels of HDL-Ch, but their values were not significantly different from the control ones. The ratio total cholesterol/HDL-Ch increased in both groups (A and B) in patients with glucose intolerance. The values for group A were: 4.33 ± 0.2 in relation to 3.3 ± 0.14, and for group B: 5.03 ± 0.38 compared to 3.86 ± 0.12 for the control groups ($p < 0.001$). The ratio HDL-Ch/LDL-Ch + VLDL-Ch decreased significantly ($p < 0.01$) in group A with or without glucose intolerance. A similar reduction was observed in group B in comparison with the control patients ($p < 0.001$). The importance of quantifying the cholesterol contents of lipoprotein fractions in order to detect early abnormalities in their metabolism was confirmed.

Agradecimiento: Los autores agradecen la asistencia técnica de la Srta. Elsa S. Ferrigutti y del Sr. L. J. Argento en la compaginación de este trabajo.

Bibliografía

1. Avogaro P, Bittolo Bon G, Cazzolato G, Quinci GB, Belussi F: Plasma levels of apolipoprotein A and apolipoprotein B in human atherosclerosis. *Artery* 4: 385, 1978.
2. Beaumont JL, Carlson LA, Cooper GR, Fejfar Z, Fredrickson DS, Strasser T: Classification of hyperlipidaemias and hyperlipoproteinaemias. *Bull World Heath Org* 43: 891, 1970.
3. Bouissou H, de Graeve J, Thiers JC, Solera ML, Valdiguie P: Cutaneous cholesterol and plasma lipoproteins in young subjects. *Biomedicine* 31: 236, 1979.
4. Carlson LS, Ericsson M: Quantitative and qualitative serum lipoprotein analysis: Part. I. Studies in healthy men and women. *Atherosclerosis* 21: 417, 1975.
5. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel W, Dawber T: High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. *Am J Med* 62: 707, 1977.
6. Henry RJ: Determinación de ácido úrico mediante reacción con fosfotungstato alcalino. *En:* Química Clínica, Bases y Principios. Editorial Jims, Barcelona, 1969, Tomo I, p 337.
7. Hollister LE, Overall JE, Snow HL: Relationship of obesity to serum triglyceride, cholesterol, and uric acid, and to plasma-glucose levels. *Am J Clin Nutr* 20: 777, 1967.
8. Hulley SB, Cohen R, Widdowson G: Plasma high-density lipoprotein cholesterol level: Influence of risk factor intervention. *J Am Med Assoc* 238: 2269, 1977.
9. Kannel WB, Mc Gee DL: Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: The Framingham study. *Diabetes Care* 2: 120, 1979.
10. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T: Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. *Ann Intern Med* 90: 85, 1979.
11. Keen H, Jarrett RJ, Alberti KGM: Diabetes Mellitus: A new look at diagnostic criteria. *Diabetología* 16: 283, 1979.
12. Laurell S: A method for routine determinations of plasma triglycerides. *Scand J Clin Lab Invest* 18: 668, 1966.
13. Leffler HH: Estimation of cholesterol in serum. *Am J Clin Pathol* 31: 310, 1959.
14. Lipid Research Clinics Program, Manual of Laboratory Operations. DHEW Publication 75: 628, 1974.
15. Miller NE, Thelle DS, Førde OH, Mjøs OD: The Tromso heart study. High density lipoprotein and coronary heart disease: a prospective case control study. *Lancet* 1: 965, 1977.
16. Nikkilä EA, Taskinen MR, Kekki M: Relation plasma high-density lipoprotein cholesterol to lipoprotein-lipase activity in adipose tissue and skeletal muscle of man. *Atherosclerosis* 29: 497, 1978.
17. Rhoads GG, Gulbrandsen CL, Kagan A: Serum lipoproteins and coronary heart disease in a population study of Hawaii Japanese men. *N Engl J Med* 294: 293, 1976.
18. Rossner S, Kjellin K, Mettinger KL, Siden A, Söderström CE: Normal serum-cholesteroy but low HDL-cholesterol concentration in young patients with ischaemic cerebrovascular disease. *Lancet* 1: 577, 1978.
19. Snedecor GW, Cochran WG: Statistical methods. The IOWA State University Press, Ames, IOWA, Sixth Edition, 1967, p 172.
20. Taskinen MR, Nikkilä EA: Lipoprotein-lipase activity of adipose tissue and skeletal muscle in insulin-deficient human diabetes. Relation to high-density and very-low-density lipoproteins and response to treatment. *Diabetología* 17: 351, 1979.
21. Thompson PD, Jeffery R, Wing R, Wood P: Unexpected decrease in plasma high density lipoprotein cholesterol with weight loss. *Am J Clin Nutr* 32: 2016, 1979.
22. Williams P, Robinson D, Bailey A: High density lipoprotein and coronary risk factors in normal men. *Lancet* 1: 72, 1979.
23. Wilson DE, Spiger MJ, Done CA: A dual precipitation method for quantitative plasma lipoprotein-measurement without ultracentrifugation. *J Lab Clin Med* 82: 473, 1973.
24. Wilson DE, Lees R: Metabolic relationships among the plasma lipoproteins. Reciprocal changes in the concentrations of very low and low density lipoproteins in man. *J Clin Invest* 51: 1051, 1972.
25. Witztum J, Schonfeld G: High density lipoproteins. *Diabetes* 28: 326, 1979.
26. Wood PD, Haskell W, Klein H: The distribution of plasma lipoproteins in middle-aged male runners. *Metabolism* 25: 1249, 1976.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 459-466 (1981)

COMPARATIVE STUDY OF JUNIN AND HERPES SIMPLEX VIRUSES IN MOUSE BRAIN MONOLAYER CULTURES *

MARIA I. BERRIA **, E. F. LASCANO **

Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Both Junin and herpes simplex viruses are encephalitogenic for mice, but they proceed along very different pathogenic routes: Junin virus appears to have an immunogenic mode of action [2, 10, 23, 27, 29, 31] while a direct necrotizing effect seems to predominate in herpes simplex encephalitis [14, 22, 24, 26, 32]. The purpose of this study was to define the sequential stages of viral multiplication taking place in an in vitro system — monolayer cultures derived from mouse brain cells — and to compare the cellular in vitro infections caused by two viruses with such widely different effects in mice. Virus-cell interaction studies were carried out by means of virological, histological, immunoenzymatic and ultrastructural techniques. The conclusions drawn from observations upon nervous tissue in culture, with all the limitations resulting from its in vitro nature, allow some extrapolation of data to situations that occur in the intact organism. Therefore, the dissociated brain cells can be considered an excellent model system to discriminate the effects of encephalitogenic viruses in a manner which is not feasible in vivo.

— — — —

Received: 21-III-1981. Accepted: 15-IV-1981.

* Partially presented in XXV Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mendoza, November, 1980.

** Member of Research Career, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Postal address: Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina.

Material and methods

Preparation of cell cultures. Brains were obtained from Swiss albino mice within 24 hours after birth. At the beginning of the study, cell inocula for the monolayer cultures were obtained by means of several cycles of trypsination, and the cell suspensions were seeded at a level of 600 000 to 800 000 cells per ml [1, 15]. Later on, however, better results were obtained by a different procedure: the brain was first broken up in small pieces with a scalpel and then further fragmented by repeated pipette transfer. The little bits thus obtained were seeded in flasks; these microexplants gave origin to monolayers, which were trypsinized after 8-10 days of growth; the resulting cell suspension was distributed in Leighton tubes, where monolayers formed in about 24-48 hours. The culture medium utilized by Illavia and Webb [12] was used for cell growth. Cell monolayers were stained by Giemsa technique and by the already described procedure [15] based on silver impregnation.

Comparison of control (non-inoculated) and virus-infected cultures. Viral inocula were derived from Junin virus, strain XJ-Clon 3 (provided by Mercedes C. Weissenbacher, Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires) and from herpes simplex virus, type 1, strain VR-3 (provided by John A. Stewart, Perinatal Viro-

logy Research Laboratory, Center for Disease Control, Atlanta, GA). Monolayers were infected with 0.1 ml of mouse brain suspension containing, respectively, 10^4 LD_{50} of Junin virus and 10^3 LD_{50} of herpes simplex virus. After inoculation, minimal essential medium (MEM) plus 2 per cent fetal bovine serum was used for maintenance. Infected cultures, as well as non-inoculated controls, were daily examined by light microscopy. To observe the appearance and features of a possible cytopathic effect, staining by Giemsa method was resorted to.

Staining of viral antigen by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique [8, 28]. Cells on the coverslips were fixed for 2 minutes with chilled methanol [18, 19]. This was followed by repeated washings with tris-buffered saline 0.05 M, pH 7.6 with 1 per cent normal goat serum added (TB SG). The first antisera, anti-Junin and anti-herpes simplex type 1, were applied in dilutions 1/100 and 1/250, respectively, and were left to act for 24 hours at 4° C. Both antisera had been obtained in rabbits: anti-Junin antiserum was prepared by the authors [18, 19], and anti-herpes simplex antiserum came from a commercial source (Dako Lab.). The second antiserum was goat anti-rabbit IgG (Cappel Lab.) diluted 1/250, and was applied for 30 minutes at room temperature. The third antiserum-reagent, PAP, was produced in rabbits (Cappel Lab.); after dilution 1/250, it was applied during 30 minutes at room temperature. After application of each antiserum, the preparations were thoroughly washed with TBSG, which was also used for dilution of the antisera. Peroxidase incubation was made with 0.03 percent 3-3'-diamino-benzidine (Sigma Lab.) diluted in TBS plus 0.05 per cent hydrogen peroxide. This last step was done under microscope surveillance, and was interrupted by washing the coverslip with distilled water. Thereafter, each preparation was lightly stained with Mayer's hematoxylin, and mounted. Together with these preparations, two negative control specimens were examined: *a)* infected monolayers, in which normal rabbit serum was substituted for the first antiserum; and *b)* non-inoculated monolayers, processed in a manner identical to that of the labelled monolayers.

Electron microscopy of cell cultures. Monolayers grown in flasks were scraped and centrifuged at 1800 rpm during 10 minutes. Pellets were fixed in 1 per cent paraformaldehyde in Millonig buffer for 45 minutes. Thereafter, they were post-fixed in 1 per cent osmium tetroxide in Millonig buffer for 90 minutes; washed several times in 50 per cent ethanol; treated with saturated uranyl acetate in 50 per cent ethanol for 60 minutes; dehydrated in graded ethanols; treated with recently distilled acetone; and embedded in Vestopal. Sections were cut with glass knives, sequentially stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined in a Siemens Elmiskop 101 electron microscope.

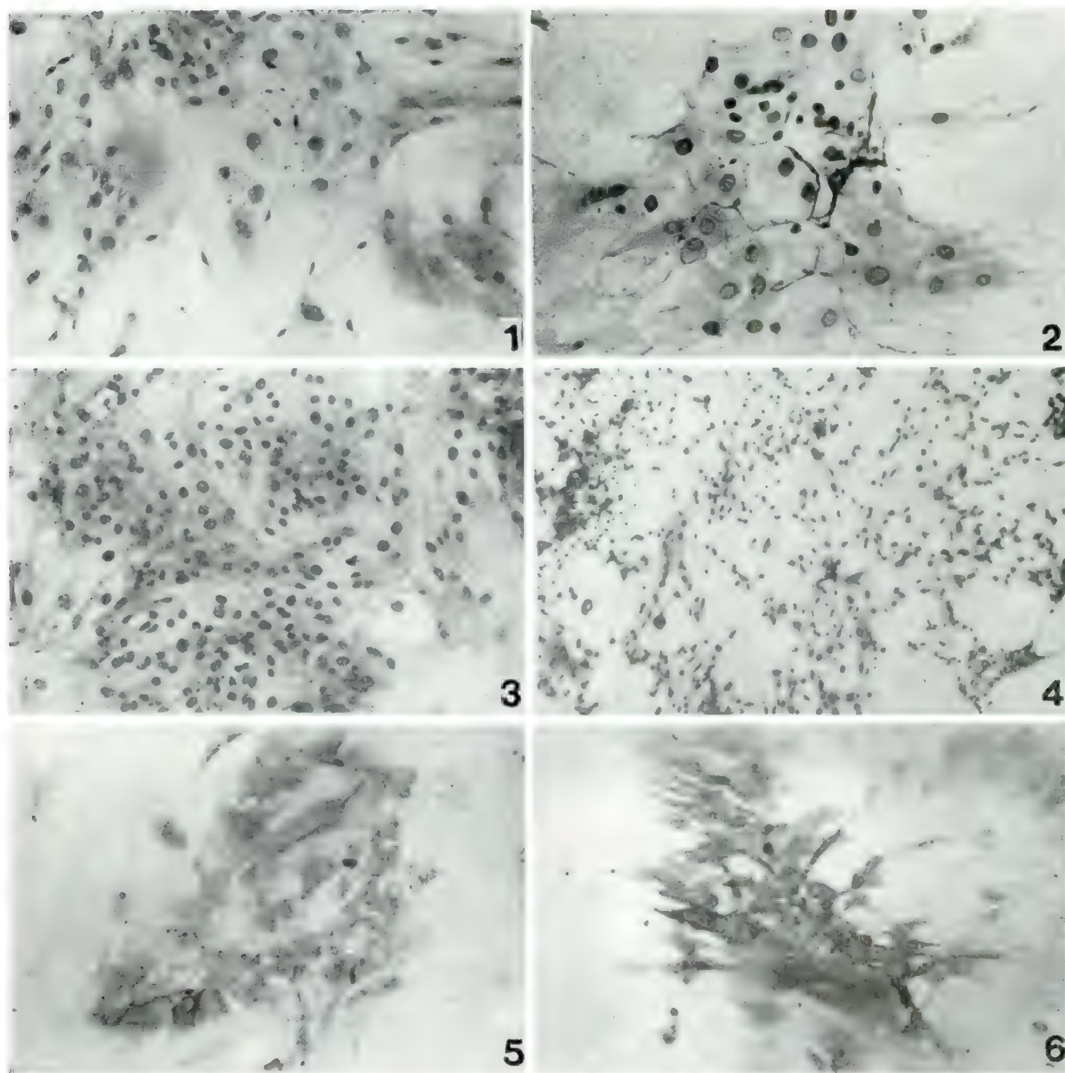
Infectivity titration of cell culture supernatants. Titrations were carried out by intracerebral inoculation of newborn mice, and titers were calculated by the Reed and Muench method.

Results

Histological features of the cultures. The monolayers were derived from the multiplication of isolated cells, as well as from the growth of microexplants. In growth derived from isolated cells, fusiform cells with central located nuclei predominated, forming a loose network. Foci originated in microexplants were, however, more frequently encountered; the cells in this case grew radially from the central cluster and gradually covered the entire glass surface. Emerging from the microexplants small polygonal cells were observed, growing progressively larger toward the periphery, wherein their shape was fusiform or stellate, with numerous and complex extensions. Giemsa staining showed that such cells had characteristics of astrocytes (Fig. 1), and were the cells most frequently found in the monolayer. Apart from these, although much lesser in number, smaller cells with a dense central nucleus and long cytoplasmic extensions were also seen (Fig. 1), reproducing the morphological features of connective cells. The differentiation of the culture in two cell types, astrocytes and probably microglia, was also observed in silver-impregnated preparations (Fig. 2), a procedure which had already been used [15] to identify the astrocyte.

Evaluation of the viral cytopathic effect. During the two week period of daily, light microscopy observation, no difference was detected between the normal control cultures and those infected with Junin virus (Fig. 3). This condition of the mouse brain cell monolayers had already been observed with Junin [15] and with other viruses, such a Kyasanur Forest [11, 13], Langat [4, 11, 13] and West Nile [13].

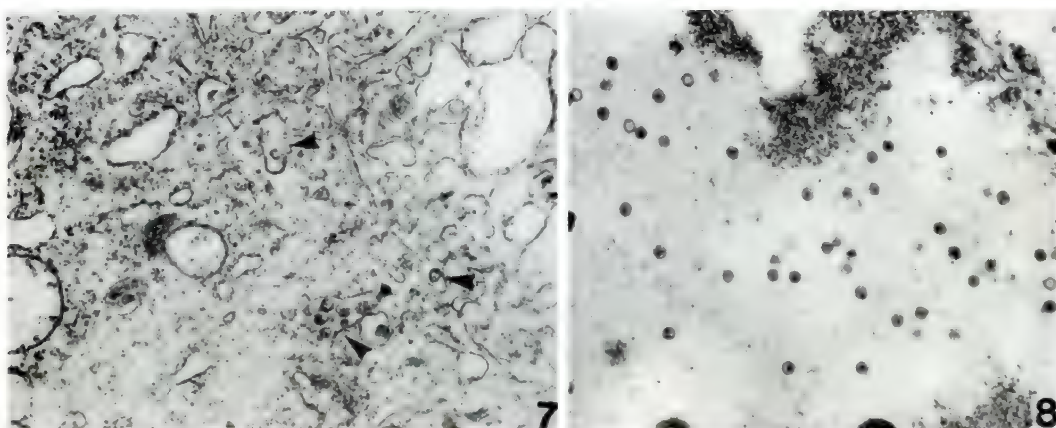
On the other hand, herpes simplex virus produced a cytopathic effect, already detectable 24 hours pi and massively evident by the 72nd hour (Fig. 4). In sequential order, at 24 hours pi, the lesions consisted in enlargement of the nucleoli, condensation and margination of chromatin, and



Figs. 1-6.— Mouse brain monolayer culture: **1**, The photomicrograph shows the features of the astrocytes, which predominate in the monolayer and of the connective cells, which, in view of their minute elongated nuclei and the very long cytoplasmic processes could be interpreted as pertaining to the microglia. (Giemsa stain) x 250; **2**, The cells with abundant cytoplasm and short processes are astrocytes; the small cells with long cytoplasmic processes are elements of microglial nature. (Silver stain) x 250; **3**, After 12 days of Junin virus infection. Most of the cells are normal looking astrocytes, i.e. without any apparent cytopathic effect. (Giemsa stain) x 100; **4**, Three days after herpes simplex virus infection. The cytopathic effect is evident: sparse disposition of the monolayer, with many necrotic cells featuring picnotic nuclei. (Giemsa stain) x 60; **5**, After 6 days of Junin virus infection. Junin PAP-positive astrocytes with variable amounts of antigen. (PAP method) x 200; **6**, After 2 days of herpes simplex virus infection. Herpes simplex PAP-positive astrocytes which stand out sharply from the negative cells in the background. (PAP method) x 200.

appearance of inclusion bodies; at 48 hours pi, small foci of round, piled up cells, were observed, ready to get detached from the glass surface; after 72 hours pi, areas of degeneration had already covered almost all the monolayer. The cytopathic effect was essentially constituted by necrosis; the formation of giant multinucleated cells was not observed with the frequency with which herpes simplex usually induces it in other tissue cultures (primary cultures of rabbit, hamster and human fetus kidneys; Vero, HeLa, HEp-2, BHK lines, etc.).

Detection of viral antigen. Both the cultures infected with Junin virus (Fig. 5) and those inoculated with herpes simplex



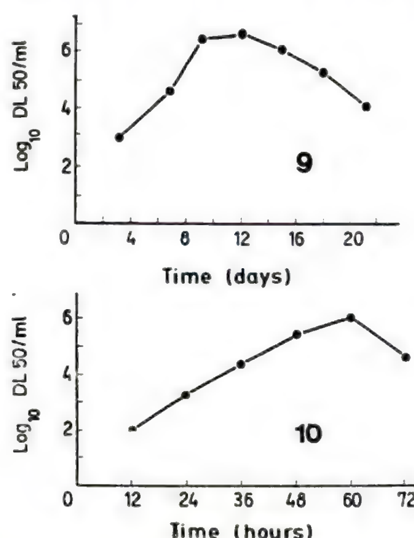
Figs. 7-8. — Mouse brain monolayer culture. **7**, Ten days after Junin virus infection. The arrows show viral particles within pseudo-vacuoles formed by invagination of an astrocyte cell membrane. Within the clear cytoplasm, gliofibrils may be observed. x 35 000; **8**, Two days after herpes simplex virus infection. Numerous capsids and nucleocapsids within an astrocyte nucleus. x 25 000.

virus (Fig. 6) showed PAP-positive cells. In both cases, these cells had their cytoplasm filled with dark-brown granules, located both in the perikarion and in the cytoplasmic processes. The positive cells stood out sharply from the non-infected ones. The background of the preparations was free from non-specific staining. Both kinds of control preparations were always negative. Staining with Junin antigen was attained only after 72 hours pi thus indicating a delay of antigen production in this cellular system, in comparison with what happens in Vero cells, where it occurs at the 24th hour pi [19]. Moreover, the positive-cell foci remain isolated, separated from other similar groups of cells by non-infected areas which persist up to the end of the observation period.

On the contrary, the presence of herpes simplex antigen was already evident 12 hours pi, and the foci of positive cells grew rapidly in size; thus, at the 72nd hour pi, the antigen was observed in almost the whole monolayer.

Visualization of viral multiplication. Electron microscope observation confirmed the identity of the cells previously described as astrocytes. They had leptochromatic nuclei, clear gliofibril-containing cytoplasms, and scanty organelles. When these cells were infected with Junin virus, budding particles were observed in the cell membrane (Fig. 7), thus confirming earlier studies [15]. In the infection of the same cultures with herpes simplex virus, abundant capsids and nucleocapsids, i.e. immature particles, were seen within the nuclei (Fig. 8). Mature particles, with their characteristic envelopes, were observed within the cisterns of the granular endoplasmic reticulum.

Detection of infectivity. The highest infective titers in supernatants of monolayers infected with Junin virus were reached between 8 and 16 days pi (Fig. 9),



Figs. 9-10. — **9**, Growth curve of Junin virus in the supernatants of mouse brain monolayer cultures; **10**, Growth curve of herpes simplex virus in the supernatants of mouse brain monolayer cultures.

and were lower and delayed in comparison with titers that can be obtained in any other cell types (Vero, BHP, etc.). This contrasts with the precociousness and speed of ascension of the herpes simplex virus titers (Fig. 10), which coincided with the progress of cytopathic effect and intracellular antigen development.

Discussion

The results obtained indicate that both viruses, Junin and herpes simplex, grew in cultures derived from mouse brain whose predominant cell type was the astrocyte. Both viruses, of quite different behavior in the central nervous system of the entire animal, differed also in the way they multiplied in the in vitro system.

Junin virus multiplied within the cells without provoking lysis; moreover, toward the end of the observation period, the infected monolayer appeared to have grown more than in the controls. This apparent induction of glial proliferating activity has been observed with other viruses, both in the brain of mice inoculated by a peripheral route [33] and in monolayers derived from the central nervous system [4, 11, 13]. Studies carried out in the brain of baby mice infected with Junin virus have shown viral multiplication in both neurons and astrocytes [15], accompanied by the presence of viral antigen, as demonstrated by immunofluorescence [7]; all this contrasted with a very moderate histopathological reaction [16], limited to capillary hyperemia and to the occasional presence of pericapillary sparse lymphoid cells, in turn surrounded by proliferating microglial cells. Even though the picture of brain encephalitis produced by this virus in mice has been considered as the consequence of an immunological response, and not of the direct action of the virus, attention should be paid to the observed affinity of Junin virus for the astrocyte, which is being confirmed by the present studies in non-neuronal cell monolayers. The fact that astrocytes give support to viral multiplication without experiencing cytolysis, suggests that Junin virus might be perpetuated under the form of a persistent infection of the central nervous system. This protracted infection has already been described in surviving mice after intracerebral inoculation [5, 6], with persistence of virus in spite of the presence of specific neutralizing antibodies. Perhaps one of the mechanisms involved in the persistence of this virus in the central nervous system may be the continuous non-lytic multiplication in neuroglia. Although the demonstration of a persistent infection may be attained by means of laborious co-culture methods, when such infections maintain a high level of antigen production, they may be easily identifiable by immunolabelling techniques; and the peroxidase-antiperoxidase method, which had already shown specificity and sensitivity in the detection of Junin antigen in the suckling mouse brain [18], has confirmed those qualities in its application on cell monolayers derived from the brain.

Regarding herpes simplex, it induced cellular lysis consecutive to multiplication, the peculiar susceptibility of the astrocyte being noteworthy. Although it has been demonstrated that the virus can multiply within all the central nervous system cell types, both in the entire mouse brain [22] and in derived cultures [9, 20, 21], it should be pointed out that, in explants, a more rapid progress of the infection has been observed in non-neuronal cells than in neurons [25]; and that, in cell fractions, the virus has shown greater adsorption on glial cells [30]. Apparently, while herpes simplex virus is able to maintain a latent infection in neurons, on the other hand, when it is adsorbed to glial cells, it may replicate at sufficiently high levels to induce a productive infection with the subsequent tissue damage. The kind of affinity existing between herpes simplex virus and the astrocyte remains to be established; for that purpose, the continuance of enzymatic immunostaining should be encouraged, in view of the results obtained in vivo [17] and in cell cultures derived from the brain.

In the in vitro system employed for the present study a remarkable difference could be established between the effects of the multiplication of the two viruses;

it is possible, however, that a higher precision could be attained by working with purified astrocyte populations. The obtention of a glial monoculture, definable by morphological, neuro-physiological and biochemical parameters [3], would supply an excellent substrate for a rigorous study of the virus-central nervous system interaction, since it is possible that the primary aggression takes place in the astrocyte, and the subsequent neuronal repercussion is a secondary phenomenon.

Summary

Cell monolayers derived from mouse brain were established and two cellular types were identified with Giemsa and with silver techniques: astrocytes and microglia, the former being the predominant one. The monolayers were infected with one of two viruses, widely differing in the pathogenesis assigned to their in vivo action on the central nervous system of the mouse: Junin virus, which is assumed to act through an immunological mechanism, and herpes simplex virus, with a predominantly necrotizing effect. Both viruses grew in the cultures, and their development was monitored by daily observation of the monolayers by light microscopy, viral antigen detection by enzymatic immunostaining, ultrastructural examination of the cells, and infectivity titration of the supernatants by intracerebral inoculation of baby mice. It was observed that Junin virus multiplied in the monolayers without causing any cytopathic effect, while herpes virus provoked cell lysis. Immunostaining with the peroxidase-antiperoxidase (PAP) method showed staining of Junin antigen at 72 hours pi, while herpes simplex antigen made itself evident at the 12th hour pi and was present in almost 100 per cent of the monolayer after 72 hours. Electron microscopy confirmed that the cells described as astrocytes were really so. Moreover, viral multiplication was observed in those cells, both in the case of Junin virus (budding particles at the cell membrane surface), and of herpes simplex virus (immature particles in the nucleus and mature ones in the cistern of the granular cytoplasmic reticulum). The highest infective titers in the supernatants of cultures infected with Junin virus were found between 8 and 16 days pi, the foci of positive-PAP cells remaining isolated during this whole period. On the other hand, the early appearance and the speed of increase of infective titers of herpes simplex virus coincided with the fast progression of the cytopathic effect and with the accelerated rate of detection of the corresponding antigen It can be concluded that, with the system for in vitro infection utilized in this study, a remarkable difference could be established regarding the effects of Junin and herpes simplex infections, confirming the astrocyte as an adequate substrate for the study of the interaction between viruses and central nervous system.

Resumen

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS VIRUS JUNIN Y HERPES SIMPLEX EN MONOCAPAS CELULARES DE ENCÉFALO DE RATÓN.

Se desarrollaron monocapas celulares derivadas de encéfalo de ratón y, por tinciones con Giemsa y con sales de plata, se identificaron dos tipos celulares, astrocitos y microglia, siendo el astrocito el elemento predominante. Las monocapas fueron infectadas con dos virus de distintas características en su patogenia sobre el sistema nervioso central del ratón entero: el Junin, que ejercería su efecto a través de un mecanismo inmunológico, y el herpes simplex, de predominante acción necrotizante directa. Los dos virus ensayados propagaron en el cultivo, y su desarrollo fue controlado por observación diaria de las monocapas por microscopía de luz, detección de antígenos virales por inmunomarcación enzimática, examen ultraestructural de las células y titulación de la infectividad de los sobrenadantes por inoculación intracerebral de ratones lactantes. Se observó que el Junin multiplicaba en las monocapas sin causar efecto citopático, en tanto que el herpes simplex provocaba lisis celular.

La inmunomarcación con el método peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) mostró tinción del antígeno Junin a las 72 hs de infección, en tanto que el antígeno herpes simplex se hizo evidente a las 12 h de infección, detectándose en el casi 100 % de la monocapa pasadas las 72 h. Por microscopía electrónica se confirmó que las células descriptas como astrocitos en el examen por microscopía de luz, lo eran en verdad por sus caracteres ultraestructurales. Además, en esos astrocitos se comprobó multiplicación viral, tanto del Junin (partículas brotando de la membrana celular) como del herpes simplex (partículas inmaduras en los núcleos y maduras en la cisterna del retículo endoplásmico granuloso). Los máximos títulos infectivos de monocapas infectadas con Junin se observaron entre los días 8 a 16 posteriores a la inoculación, período en que se mantuvo la circunscripción de focos de células positivas por inmunomarcación. En cambio, la precocidad y la rapidez con que se elevaron los títulos de herpes simplex en los sobrenadantes, coincidieron con la progresión del efecto citopático y del ritmo de detección del antígeno. Se concluye que con el sistema in vitro empleado se pudo establecer una marcada diferencia en cuanto a efectos de Junin y de herpes simplex, confirmando al astrocito como un adecuado sustrato para el estudio de la interacción virus-sistema nervioso central.

Acknowledgments: This work was supported in part by grants from SECYT (Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología) and Fundación Emilio Ocampo.

References

1. Berría MI, Lascano EF: Cultivos de monocapas celulares a partir de cerebros humanos y de encéfalo de ratón. *Medicina (Bs Aires)* 32: 798, 1972.
2. Besuschio SC, Weissenbacher MC, Schmuñis GA: Different histopathological response to Arenavirus infection in thymectomized mice. *Arch Ges Virusforsch* 40: 21, 1973.
3. Bock E: Immunochemical markers in primary cultures and in cell lines. *In:* Cell, Tissue, and Organ Cultures in Neurobiology. S. Fedoroff, L. Hertz (eds), Academic Press, New York, 1977, p 407.
4. Boulton PS, Webb HE, Fairbairn GE, Illavia SJ: An electron microscopic study of Langat virus in tissue culture of the nonneuronal cells of mouse brain. *Brain* 94: 403, 1971.
5. Boxaca MC, Giovanniello OA: Transmisión vertical del virus Junin en una colonia cerrada de ratones. *Medicina (Bs Aires)* 35: 460, 1975.
6. Boxaca MC, Giovanniello OA, Romo AI: Infección congénita con virus Junin en el ratón. *Medicina (Bs Aires)* 38: 404, 1978.
7. Cossio PM, Carballal G, Berría MI, Lascano EF, Rabinovich A, Arana RM: Estudio inmunohistoquímico e histológico del sistema nervioso central de ratones lactantes y adultos infectados con la cepa XJ-Cl_3 de virus Junin. Inmunofluorescencia. *Medicina (Bs Aires)* 39: 787, 1979.
8. Erlandsen SL, Parsons JA, Burke JP, Redick JA, van Orden DE, van Orden LS: A modification of the unlabeled antibody enzyme method using heterologous antisera for the light microscopic and ultrastructural localization of insulin, glucagon and growth hormone. *J Histochem Cytochem* 23: 666, 1977.
9. Feldman LA, Sheppard RD, Bornstein MB: Herpes simplex virus-host cell relationships in organized cultures of mammalian nerve tissues. *J Virol* 2: 621, 1968.
10. Giovanniello OA, Boxaca MC: Effect of cyclophosphamide on Junin virus infection in mice. *Medicina (Bs Aires)* 33: 368, 1973.
11. Illavia SJ, Webb HE: Maintenance of encephalitogenic viruses by non-neuronal cerebral cells. *Br Med J* 1: 94, 1969.
12. Illavia SJ, Webb HE: An encephalitogenic virus (Langat) in mice. Isolation and persistence in cultures of brain after intraperitoneal infection with the virus. *Lancet* 2: 284, 1970.
13. Illavia SJ, Webb HE: The effect of encephalitogenic viruses in tissue culture of nonneuronal cells of mouse and human brain. *Neurology* 22: 619, 1972.
14. Kristensson K, Haltin M: Cytochemical and ultrastructural studies of chromatolysis in neurons infected with herpes simplex virus. *Virchows Arch Abt B Zellpath* 41: 335, 1970.
15. Lascano EF, Berría MI: Ultrastructure of Junin virus in mouse whole brain and mouse brain tissue cultures. *J Virol* 14: 965 1974.
16. Lascano EF, Berría MI, Cossio PM, Carballal G, Rabinovich A, Arana RM: Estudio inmunohistoquímico e histológico del sistema nervioso central de ratones lactantes y adultos infectados con la cepa XJ-Cl_3 de virus Junin. II. Microscopía óptica y electrónica. *Medicina (Bs Aires)* 39: 788, 1979.
17. Lascano EF, Berría MI: Histological study of the progression of herpes simplex virus in mice. *Arch Virol* 64: 67, 1980.
18. Lascano EF, Berría MI, Candurra NA: Inmunomarcación de antígeno Junin en monocapas celulares y en encéfalo de ratón. Conjoint Meeting (Asociación Argentina de Mi-

crobiología - Sociedad Argentina de Virología), Valle Hermoso, Mayo 1980.
19. Lascano EF, Berría MI, Candurra NA: Inmunomarcación de antígeno Junin en monocapas celulares. Su aplicación para el diagnóstico virológico rápido de la Fiebre Hemorrágica Argentina. *Medicina (Bs Aires)* 40: 785, 1980.
20. Leetsma JE, Bornstein MB, Sheppard BS, Feldman LA: Ultrastructural aspects of herpes simplex virus infection in organized cultures of mammalian nervous tissue. *Lab Invest* 2: 70, 1969.
21. Mannweiler KJ, Palacios O: Zuchtung und Vermehrung von Herpes simplex-Virus in Zellkulturen Vom Nervensystem. *Acta Neuropath (Berl)* 12: 270, 1969.
22. Norris FH: An ultrastructure study of herpes simplex virus encephalitis. *J Neuropath Exper Neurol* 31: 611, 1972.
23. Nota NR, Nejamkis MR, Frigerio MJ, Guerrero LB de: Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junin. Efecto del suero antitimocito. *Medicina (Bs Aires)* 33: 398, 1973.
24. Rabin ER, Jenson AB, Melnick JL: Herpes simplex virus in mice: electron microsopy of neural spread. *Science* 162: 126, 1968.
25. Rajcáni J, Scott BS: Growth of herpes simplex virus in cultures of dissociated human nervous tissue. *Acta Virol* 16: 25, 1972.
26. Rajcáni J, Szantó J: Pathogenicity of laboratory-maintained and low-passaged strains of herpes virus hominis in suckling mice. *Acta Virol* 17: 227, 1973.
27. Schmuñis GA, Weissenbacher MC, Parodi AS: Tolerance to Junin virus in thymectomized mice. *Arch Ges Virusforsch* 21: 200, 1967.
28. Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG: The unlabeled antibody enzyme method of immunochemistry. Preparation and properties of soluble antigen antibody complex (Horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18: 315, 1970.
29. Taratuto AL, Tkaczevski LZ de, Nota NR, Nejamkis MR, Giovanniello OA: Junin virus encephalitis in mice: its inhibition by antithymocite serum. *Arch Ges Virusforsch* 26: 63, 1973.
30. Vahlne A, Nystrom B, Sandberg M, Hamberger A, Lycke E: Attachment of herpes simplex virus to neurons and glial cells. *J Gen Virol* 4: 359, 1978.
31. Weissenbacher MC, Schmuñis GA, Parodi AS: Junin virus multiplication in thymectomized mice. Effect of thymus and immunocompetent cell grafting. *Arch Ges Virusforsch* 26: 63, 1969.
32. Yamamoto T, Otani S, Shiraki H: A study of the evolution of viral infection in experimental herpes simplex encephalitis and rabies by means of fluorescent antibody. *Acta Neuropath* 5: 288, 1965.
33. Zlotnik I: The reaction of astrocytes to acute virus infections of the central nervous system. *Br J Exp Path* 49: 555, 1968.

— — — —

Happy the Cicadas live, since they all have voiceless wives.

Las chicharras machos llevan una vida feliz desde que todas tienen esposas mudas.

XENARCHUS

Poeta griego citado por Charles Darwin:
The descent of man, 1871

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 467-470 (1981)

INMUNIZACION DE COBAYOS CONTRA LA FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA CON VIRUS TACARIBE REPLICADO EN CELULAS DIPLOIDES HUMANAS

ELSA B. DAMONTE *, M. A. CALELLO, CELIA E. COTO *, MERCEDES C. WEISSENBACHER

Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

En publicaciones anteriores hemos demostrado que la inoculación de virus Tacaribe es inocua para los cobayos y los protege contra el desafío con dosis letales de virus Junin [3, 7] durante períodos prolongados de tiempo. Dicha protección va acompañada con la producción de anticuerpos neutralizantes específicos contra virus Junin [7]. Resultados similares se obtuvieron trabajando con primates del Nuevo Mundo, como el *Callithrix jacchus* que reprodujo en gran medida los resultados encontrados con cobayos [1]. Sobre estas bases, se pudo considerar la posibilidad que el virus Tacaribe sirviera como vacuna heteróloga contra el virus Junin. Dado que los sustratos permisibles para vacunas atenuadas de uso humano son células diploides, decidimos evaluar la protección que ejercía sobre el cobayo el virus Tacaribe cuando se lo replicaba en células diploides humanas, ya que los experimentos anteriores se habían realizado utilizando como fuente de virus cerebros de ratones neonatos.

Material y métodos

Animales: cobayos machos de exocría de 300-350 g de peso.

Células: se emplearon las células diploides MCR-5 (derivadas de tejido de pulmón de feto humano masculino de 14 semanas), obtenidas del Instituto Panamericano de Zoonosis. Estas células se hicieron crecer en Medio Mínimo Esencial (MEM) adicionado de 10 % de suero fetal bovino. Las líneas continuas de células RK_{13} (conejo) y Vero (mono) se propagaron en MEM con 10 % de suero de ternera y 50 μg/ml de gentamicina.

Virus: se utilizaron las cepas TRLV 11573 de virus Tacaribe y XJ de virus Junin, mantenidas en el laboratorio por pasajes a través de cerebro de ratón lactante.

Titulación de virus: el virus Tacaribe se tituló en células RK_{13} por el método de formación de placas [5].

Preparación de la semilla de virus: se infectaron células MCR-5 en el pasaje 30, crecidas en botellas de 90 cc de capacidad con 10^5 unidades formadoras de placas (UFP) de virus Tacaribe. Luego de 1 h de adsorción a 37° C, se retiró el inóculo, se lavó con solución salina de fosfato (PBS) y se agregó MEM con 3 % de suero fetal bovino. Se cosecharon por separado los sobrenadantes de los días 3, 4, 5, 6 y 7 postinfección (pi).

Determinación de anticuerpos neutralizantes: se utilizó la técnica de suero variable-virus constante anteriormente descrita [4]. El título de anticuerpos para un suero dado se expresó como la inversa de la última dilución de suero que inhibió completamente el efecto citopático de 100 $DICT_{50}$ de virus Junin o Tacaribe.

Inmunización de cobayos: se usaron 10 cobayos que fueron inoculados con 0.5 ml en cada pata por vía intramuscular, del stock semilla de virus Tacaribe sin diluir. A los 90 días postinoculación, los animales fueron desafiados con 1000 DL_{50} (para ratón) de virus Junin, junto con 5 cobayos controles normales. De los 10 cobayos infectados con Tacaribe, 5 fueron sangrados a los 22, 41, 64, 90 y 160 días post-Tacaribe para investigar en el suero de estos

---

Recibido: 8-IV-1981. Aceptado: 6-V-1981.

* Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Dirección postal: Cátedra de Virología, Departamento de Química Biológica, Pabellón 2, piso 4º, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina.

animales la presencia de anticuerpos neutralizantes contra virus Tacaribe y Junin. Los 5 restantes se mantuvieron sin sangrar para un mejor control clínico.

Resultados

Multiplicación del virus Tacaribe en células diploides

Según se puede ver en la Tabla 1, el virus Tacaribe no alcanza en células diploides títulos superiores a 2 x 10^4 UFP/ml, lo que indica que este sustrato no es muy permisivo para la multiplicación viral. Los cultivos infectados permanecieron sin alteraciones morfológicas hasta el día 11 pi, en que se produjo un efecto citopático marcado con destrucción de más del 80 % de la monocapa. Por cambios periódicos de medio, finalmente se recuperó el cultivo, que se descartó a los 14 días post-infección (pi).

TABLA 1. — *Multiplicación del virus Tacaribe en células MCR-5*

Día post-infección	Título de virus UFP/ml
3	2.0×10^4
4	2.0×10^4
5	2.2×10^4
6	7.5×10^3
7	5.0×10^3

La semilla de virus Tacaribe utilizada en este trabajo se preparó con los sobrenadantes de los días 3, 4 y 5. Después de la mezcla de estos materiales se tituló una alícuota, encontrándose un título de 1 x 10^4 UFP/ml, y el resto se inoculó en los cobayos.

Protección y formación de anticuerpos neutralizantes

Todos los cobayos inoculados con virus Tacaribe sobrevivieron al desafío con virus Junin sin presentar ningún síntoma de enfermedad, mientras que los controles murieron a los 13-14 días post-inoculación, con el cuadro hemorrágico típico de la enfermedad.

En la Figura 1 se presenta la cinética de aparición de anticuerpos neutralizantes homólogos y heterólogos. Como se puede

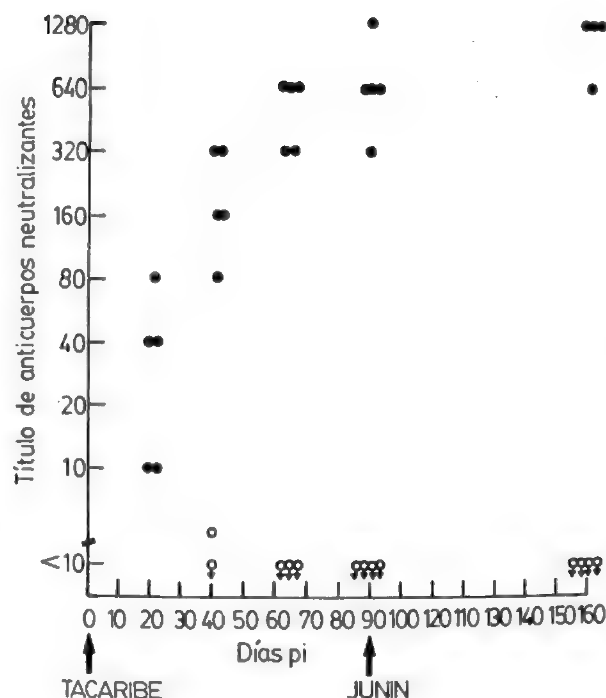


Fig. 1. — Anticuerpos neutralizantes en cobayos inoculados con Tacaribe (MCR-5) y desafiados con virus Junin; • Anticuerpos neutralizantes anti-Tacaribe; O Anticuerpos neutralizantes anti-Junin.

apreciar, los anticuerpos homólogos anti-Tacaribe se detectan en títulos significativos a los 20 días pi y aumentan en forma exponencial hasta llegar a un nivel estacionario alrededor del día 90. Contrariamente a lo esperado, los animales no desarrollaron anticuerpos neutralizantes contra virus Junin ni aún después del desafío con el mismo, aunque el período de observación se prolongó por 70 días.

Discusión

La capacidad del virus Tacaribe de replicar en un sustrato adecuado para la preparación de una vacuna atenuada de uso humano confirma la posibilidad del empleo de dicho agente como vacuna contra la FHA. Las células diploides MCR-5, derivadas de pulmón de feto humano, resultaron un sustrato adecuado para la propagación del virus Tacaribe. Aun cuando los rendimientos virales que se obtienen en dichas células no son demasiado elevados, los experimentos de inmunización llevados a cabo indican que los mismos son suficientes para desarrollar en el cobayo una eficaz protección frente al virus Junin. En efecto, la inoculación de una

única dosis de 10^4 UFP de virus Tacaribe crecido en células MCR-5 otorgó protección total al lote de cobayos estudiados, no registrándose morbilidad ni mortalidad frente al desafío con 1000 DL_{50} de virus Junin, durante el período de 70 días después del desafío en que fueron observados los animales.

Como puede observarse en la Figura 1, la inoculación de virus Tacaribe en el cobayo produjo una respuesta humoral específica, pudiendo detectarse anticuerpos neutralizantes anti-Tacaribe a partir de los 20 días post-infección. La cantidad de anticuerpos neutralizantes anti-Tacaribe presentes en el suero aumenta con el transcurso del tiempo hasta que se estabiliza alrededor de los 90 días pi. En ningún momento, ni aún después del desafío con virus Junin, se han podido detectar anticuerpos heterólogos anti-Junin. Este hecho confirma nuestras observaciones anteriores de que la formación de anticuerpos neutralizantes no es el principal factor responsable de la protección cruzada [2]. En efecto, cuando se inmunizan cobayos con dosis altas de virus Tacaribe replicado en cerebro de ratón, se detectan anticuerpos neutralizantes heterólogos anti-Junin después de los 50 días de infección, pero ya a partir de los 3 días hay una protección parcial de los animales ante la descarga con dosis letales de Junin, y luego de los 25 días dicha protección es total. Sin embargo, en esas experiencias se había detectado una respuesta anamnésica de anticuerpos anti-Junin luego del desafío [2, 4], lo que no ha ocurrido en las experiencias presentadas en este trabajo. Al presente, no estamos en condiciones de explicar este fenómeno. Probablemente la diferencia en la procedencia del virus Tacaribe usado como agente inmunizante (cerebro de ratón o cultivo de tejido) pueda explicar la ausencia o presencia de anticuerpos neutralizantes heterólogos cuando se desafía al cobayo con virus Junin procedente de cerebro de ratón. Así también debe considerarse la influencia de la técnica empleada para la detección de anticuerpos neutralizantes in vitro, utilizando como virus indicador un stock de virus Junin crecido en cerebro de ratón. Welsh [8] ha demostrado que las modificaciones que se producen en la envoltura del virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM) debido a la célula huésped determinan las características de los anticuerpos neutralizantes inducidos por dicho virus. Este fenómeno relativo a la influencia del huésped empleado para el crecimiento del virus está actualmente en estudio en nuestro laboratorio.

Varios pueden ser los mecanismos inmunes implicados en la protección cruzada. Entre Togavirus del grupo A, sistema en el que se ha descrito un fenómeno similar de protección cruzada, se ha demostrado que la inmunidad celular es el principal mecanismo responsable de dicha protección [6], pero además se observó que hay un bajo nivel de protección cruzada específica no mediada por células y cuyos orígenes aún no han sido aclarados. Existe la posibilidad de que en el sistema Junin-Tacaribe también la inmunidad celular cumpla un rol preponderante, como así también no pueden descartarse otros mecanismos adicionales tales como producción de anticuerpos neutralizantes heterólogos dependientes del complemento, fenómenos de citotoxicidad dependientes de anticuerpos o interferón.

Cualquiera sea el verdadero mecanismo involucrado en la protección, el hecho real es que la inoculación con virus Tacaribe activo presenta todas las características de una vacuna eficaz contra la FHA, cuyas ventajas sobre el uso de virus homólogo habría que considerar seriamente.

Resumen

En trabajos anteriores se ha demostrado claramente que la inoculación de virus Tacaribe proveniente de cerebro de ratón lactante protege al cobayo contra el desafío con dosis letales de virus Junin. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos cuando se emplea como antígeno inmunizante virus Tacaribe crecido en células diploides humanas, sustrato permisible para vacunas atenuadas de uso humano. La semilla de virus Tacaribe empleada en este trabajo para inmunizar los animales se preparó en células MCR-5, derivadas de tejido de pulmón de feto hu-

mano masculino de 14 semanas. Dicha semilla consistió en los sobrenadantes de células infectadas de los días 3, 4 y 5 post-infección, con un título de 1 x 10^4 UFP/ml. La inoculación de una sola dosis de 10^4 UFP de virus Tacaribe otorgó protección total al grupo de 10 cobayos estudiados, no registrándose morbilidad ni mortalidad frente al desafío, 90 días más tarde, con 1000 DL_{50} de virus Junin, cepa XJ. En dichos animales se detectaron anticuerpos neutralizantes anti-Tacaribe a partir de los 20 días pi, y fueron aumentando en forma exponencial hasta llegar a un nivel estacionario alrededor de los 90 días. Por el contrario, no se han podido detectar anticuerpos neutralizantes anti-Junin, ni aún después del desafío con dicho virus. Se plantea la posibilidad de distintos mecanismos responsables de la protección observada, que confirma la posibilidad del empleo del virus Tacaribe como vacuna contra la FHA.

Summary

IMMUNIZATION OF GUINEA PIGS AGAINST ARGENTINE HEMORRHAGIC FEVER WITH TACARIBE VIRUS GROWN IN HUMAN DIPLOID CELLS.

It has been demonstrated that guinea pigs inoculated with Tacaribe virus propagated in baby mouse brain were protected against a challenge with lethal doses of Junin virus. As Tacaribe virus could be a possible candidate to immunize humans against Junin virus, we decided to study the immunizing effect of Tacaribe virus grown in human diploid cells. For this purpose, Tacaribe virus was propagated in MCR-5 cells, derived from a 14 week-old human fetus lung. The viral stock used in this study was obtained from infected cell supernatants harvested at 3, 4 and 5 days post-infection. Ten guinea pigs were inoculated with 10^4 PFU of this virus and, 90 days later, the animals were challenged with 10^3 LD_{50} of Junin virus, XJ prototype pathogenic strain. A state of complete protection was established in the animals, which were bled on days 22, 41, 64, 90 and 160 post-Tacaribe inoculation in order to determine the titers of neutralizing antibodies against Tacaribe and Junin virus. A specific humoral response against Tacaribe virus was found (Fig. 1): neutralizing antibodies appeared on day 22 after inoculation and rose continuously until day 90. Thereafter, the level of anti-Tacaribe antibodies was maintained over a period of 160 days. No cross-reacting neutralizing antibodies against Junin virus were observed at any moment (Fig. 1). Although more experiments are needed, specially in primates, to prove Tacaribe virus innocuity, the experiments reported here strongly suggest that this virus may be used as an effective vaccine against Junin virus.

Agradecimientos: Este trabajo se realizó con aportes financieros de la Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología y de la Fundación Emilio Ocampo.

Bibliografía

1. Calello MA, Rondinone SN, Damonte EB, Coto CE, Frigerio MJ, Weissenbacher MC: Inmunización de primates contra la FHA. III Congreso Argentino de Microbiología. Resúmenes de Comunicaciones Libres, 1979.
2. Coto CE, Damonte EB, Calello MA, Weissenbacher MC: Protection of guinea pigs inoculated with Tacaribe virus against lethal doses of Junin virus. *J Inf Dis* 141: 389, 1980.
3. Coto CE, Weissenbacher MC, Calello MA: Protección del cobayo contra la Fiebre Hemorrágica Argentina por inoculación de virus del complejo Tacaribe. *Medicina (Bs Aires)* 36: 9, 1976.
4. Damonte EB, Coto CE, Calello MA, Weissenbacher MC: Inmunización heteróloga contra virus Junin. Protección temprana. *Medicina (Bs Aires)* 38: 226, 1978.
5. Damonte EB, Coto CE: Nuevo marcador biológico para diferenciar los virus Tacaribe y Junin: células RK_{13}. *Medicina (Bs Aires)* 39: 223, 1979.
6. Latif Z, Gates D, Wust CJ, Brown A: Cross Protection among Togaviruses in nude mice and littermates. *J Gen Virol* 45: 89, 1979.
7. Weissenbacher MC, Coto CE, Calello MA: Cross protection between Tacaribe complex viruses. Presence of neutralizing antibodies against Junin virus (AHF) in guinea pigs infected with Tacaribe virus. *Intervirology* 6: 42, 1975|76.
8. Welsh RM: Host cell modification of Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Newcastle disease virus altering viral inactivation by human complement. *J Immunol* 118: 348, 1977.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 471-475 (1981)

PARTIAL NORMALIZATION OF B-CELL FUNCTION BY LEVAMISOLE IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA *

R. A. DIEZ **, MARIA ELENA ESTEVEZ *, LUISA SEN *****

Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) was considered in the early sixties a lethal disease. With modern treatment protocols which combine cytotoxic drugs and corticoesteroids, ALL patients can achieve continuous complete remission (CCR) lasting for many years [17]. Due to the immunosuppressive effect of these drugs, intercurrent infections during CCR are frequent, and are responsible for death in 5-10 % of ALL patients [18]. The evaluation of the immune state in ALL patients with maintenance chemotherapy in CCR has revealed lymphopenia with a decrease in the absolute number of T and B lymphocytes, with preserved relative proportions [15, 16], accompanied by a fall in the level of serum immunoglobulins [4], mainly IgG and IgM [5], lowered specific antibody production to antigenic stimulation [3, 4], and a depressed cellular immunity, as studied in vivo by skin tests [4] and in vitro [2]. Recent clinical trials in patients receiving polychemotherapy in GATLA (Grupo Argentino para el Tratamiento de la Leucemia Aguda) protocols have shown that the addition of levamisole, an immunomodulatory drug, to conventional chemotheraphy prolongs the CCR duration [11]. The aim of the present study was to evaluate in ALL patients in CCR with and without levamisole, the functional capability of B lymphocytes induced by pokeweed mitogen (PWM) to differentiate into plasma cells.

Material and methods

Patients: A total of 21 ALL patients from GATLA protocols 10-LA-72 [14], 1-LLA-76 [13] and 1-LLA-79 were studied. All of them received, as maintenance chemotherapy, methotrexate (15 mg/m^2), vincristine (15 mg/m^2), prednisone (40 mg/m^2) and 6-mercaptopurine (300 mg/m^2). They were in CCR, receiving treatment for an interval of 3 to 40 months; 14 patients received. simultaneously with cytotoxic drugs, levamisole (100 mg/m^2) and 7 did not. Their age ranged from 3 to 18 years, with a mean of 9 years. Twelve normal subjects were studied, aged between 7 and 41 years, mean 25.8 years, of whom 3 were below 20 years (7, 13 and 18 years).

Separation of cells: Mononuclear cells were obtained from 15-20 ml defibrinated peripheral blood, by differential sedimentation in Ficoll-Hypaque gradient (d=1077) for 45 minutes at 400 G. Thereafter the cells were washed twice in Hanks' balanced salt solution (HBSS) and resuspended in RPMI 1640 (GIBCO) enriched with Tripticase soy broth 0.03 mg/ml, gluta-

Received: 11-III-1981. Accepted: 3-VI-1981.

* Partly presented at the XXIV Meeting of the Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, 1979 and in the IV International Congres of Immunology, París, 1980.

** Fellow of CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

*** Member of Research Career, CONICET.

Postal address: Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Las Heras 3092, 1425 Buenos Aires, Argentina.

mine 0.02 M, and gentamycin 85 μg/ml, all expressed as final concentration.

Detection of surface immunoglobulins: Two million cells were washed twice with phosphate buffer solution (PBS) with 1 % sodium azide, and incubated 30 minutes at 4° C with a rabbit IgG antihuman total immunoglobulin conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Dako Lab.); washed twice with PBS and resuspended in glycine buffer solution with 60 % glycerol, mounted under a coverslip and sealed with nail polish. After incubation of 30 minutes (min.) at 4° C the preparation was examined with a phase contrast and fluorescence microscope. The result was expressed as percentage of fluorescent cells after examining at least 200 cells.

PWM cultures: The cell suspension was adjusted to 10^6 cells/ml in RPMI 1640 enriched as above, plus 10 % heat-inactivated AB human Serum, and fractioned 1 ml per culture tube; PWM (GIBCO) was added to half of them (1 % final concentration), the rest being used as controls. The cells were incubated for a week at 37° C, then collected, washed twice with HBSS and resuspended in heat-inactivated fetal calf serum ($2x10^6$ cells/0.05 ml). Cell smears were prepared on glass coverslips, air dried and fixed with cold methanol-acetone 1 : 1 v/v for 2.5 min. The smears were washed with cold PBS and incubated at 37° C for 45 min. with a rabbit IgG antihuman total immunoglobulin FITC (Dako Lab) diluted 1/10 and examined under a phase contrast and fluorescence microscope. The results were expressed as percentage of cells with cytoplasmic immunoglobulins, both in the stimulated and the control cultures; at least 200 cells were examined.

Statistics: Statistical analysis was performed with Student "t" test.

Results

Due to the limited number of cells obtained in some patients, surface immunoglobulins could be studied only in 10 of them. A comparison of the number of cells with surface immunoglobulins in ALL patients and normal subjects is illustrated in Table 1. There was no statistical significance in the difference in the percentage of B cells between both groups.

TABLE 1. — *Percentage of cells with surface immunoglobulins in ALL patients and normal subjects.*

Group	Number of subjects	Surface immunoglobulins (percentage) (mean ± S.E.)
Normal	12	7.4 ± 1.4
ALL patients	10	5.4 ± 1.6 *

* The difference between both groups is not significant ($0.1 > p > 0.05$).

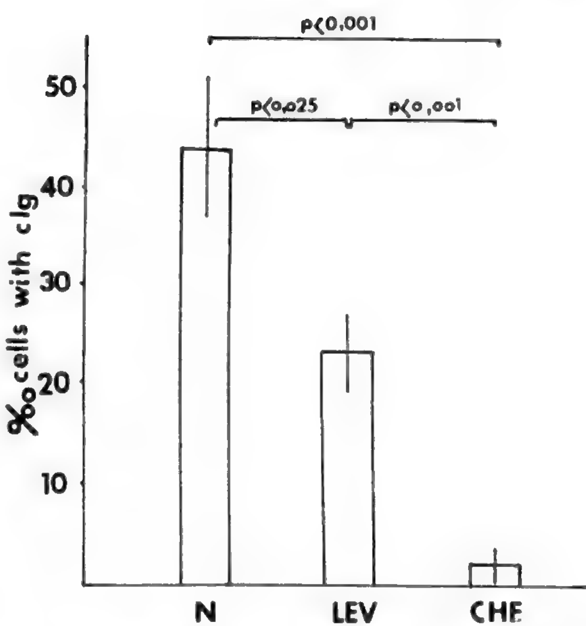


Fig. 1. — Number of cells with cytoplasmic Ig (cIg) per 1000 cells cultured with PWM. N = normal subjects (n = 12); LEV = ALL patients with chemotherapy plus levamisole (n = 14); CHE = ALL patients with chemotherapy alone (n = 7).

The ability of B lymphocytes to differentiate into plasma cells is illustrated in Figure 1, where the number of cells with cytoplasmic immunoglobulins (plasma cells) per 1000 cells cultured with PWM is shown (the values were corrected by substraction of the control cultures). The mean percentage of plasma cells, induced by PWM after 7 days culture was, in normal subjects, 4,39 % ± 0.72 % ($\bar{x}$ ± SE); in ALL patients receiving maintenance chemotherapy plus levamisole the number of plasma cells was 2.34 % ± 0.42 %, and in the group of patients receiving only chemotherapy the percentage was 0.17 % ± 0.17 %. Both groups of patients had a significantly lower differentiation ability than normal subjects ($p < 0.025$ and $p < 0.001$ for patients with and without levamisole respectively). The difference between ALL patients with chemotherapy alone and those receiving cytotoxic drugs plus levamisole was also statistically significant ($p < 0.001$).

Discussion

The results indicate that ALL patients' B lymphocytes, stimulated by PWM, show significantly lower differentiation into plas-

ma cells in vitro than normal subjects, and that this defect is partly corrected by levamisole treatment in vivo. The lack of, or decreased ability of B cells, when induced by PWM, to differentiate into plasma cells in ALL patients could be due to different factors: 1) a lower number in the proportion of B lymphocytes cultured; 2) the effect of the antileukemic drugs; 3) an intrinsic defect, induced by their disease (ALL), or 4) a difference in age between patients and normal controls. The proportion of lymphocytes with surface immunoglobulins tended to be lower in ALL patients than in normal subjects, but the difference was not significant. This result is in accordance with previous reports [15, 16]. B lymphocytes of ALL patients had a significantly lower differentiation into plasma cells than the controls. Although the control group had a different age distribution with respect to the ALL group, the 3 normal subjects whose age was below 20 years had a lymphocyte differentiation similar to the rest of the control group. The lymphoid cells present in the ALL patients studied, who were in CCR, look morphologically like lymphocytes; this, together with the fact that when ALL patients stop therapy there is a progressive restoration in their immunological functions [15, 16] suggest that the lower capability of B lymphocytes in ALL patients is probably related to the chemotherapy they receive. The fact that the proportion of T and B lymphocytes was similar in the different groups studied suggest that chemotherapy could induce an intrinsic defect in B lymphocytes' capacity to differentiate into plasma cells, or an alteration at the regulatory interactions between the cells.

Levamisole has been used as an immunomodulator in clinical trials in some solid tumors with beneficial results (breast [12], and lung [1]). In clinical trials with ALL patients, the addition of levamisole to conventional chemotherapy prolonged the CCR duration [11]; the only variation detected in these patients was an increased DNCB skin test positivity. In our ALL patients, levamisole was able to partly correct the chemotherapy induced depression in B lymphocyte capability to differentiate into plasma cell in vitro. The immunopotentiation induced by levamisole seems to depend upon an increase in the intracellular cGMP level in immunocompetent cells [6], perhaps mediated by a macrophage factor [9]; in vitro studies with human mononuclear cells showed an increased interaction between monocytes and lymphocytes, mainly T, as measured by the adherence of lymphocytes to monocytes [7]. In our study, we used a mononuclear cell enriched fraction, so that the levamisole effect could depend upon actions on B or T lymphocytes, and/or monocytes. However, in the same ALL patients, levamisole did not induce modifications in the phagocytic and lytic functions of circulating monocytes [10]. Recent studies with levamisole in normal subjects indicate that it is able to induce suppressor activity on PWM induced B cell differentiation [8]. The situation in our study is very different, since ALL patients were receiving cytotoxic drugs simultaneously with levamisole; so, instead of detecting stimulation over normal activity, we are studying recovery of depressed functional capability. Studies with levamisole in vitro, pointing to a clarification of the target of levamisole effect in ALL patients, are currently under way.

Summary

Previous clinical trials have shown that levamisole is useful for prolonging the continuous complete remission in acute lymphoblastic leukemia. The aim of this study was to evaluate the effect of the addition of levamisole to the maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia on B-cell differentiation into plasma cell, as induced by PWM in vitro. Although there was no significant difference in the B cell proportion between patients and normal subject, B cell from patients with chemotherapy alone had a lower differentiation level than normal subjects, while those patients who received chemotherapy plus levamisole had an intermediate differentiation. These results suggest that cytotoxic chemotherapy could induce an intrinsic defect in B cell ability to differentiate into plasma cell, or interfere at

the regulatory interactions between different cell populations, and that levamisole is capable of partly correcting this defect.

Resumen

CORRECCIÓN PARCIAL DE LA FUNCIÓN IN VITRO DE LOS LINFOCITOS B EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA POR EL LEVAMISOL.

Estudios clínicos previos han demostrado que el agregado de levamisol a los protocolos convencionales de quimioterapia en leucemia linfoblástica aguda (LLA) es capaz de aumentar la duración de la remisión continua y completa (RCC). El propósito de este trabajo fue establecer el efecto del levamisol sobre la capacidad funcional de linfocitos B de pacientes de LLA en RCC a través de su diferenciación a células plasmáticas inducida por PWM en cultivo. Se estudiaron 12 sujetos normales, 14 pacientes con LLA que incluían levamisol en su tratamiento y 7 pacientes con LLA que sólo recibían quimioterapia convencional. Aunque no había diferencia significativa en el número de células B entre los pacientes y los controles normales, las células B de los pacientes con quimioterapia exclusivamente mostraron menor capacidad de diferenciación que los sujetos normales, mientras que los pacientes que recibían levamisol tenían una capacidad intermedia (Fig. 1). Estos resultados sugieren que los citostáticos pueden inducir un defecto intrínseco en la capacidad de los linfocitos B para diferenciarse a célula plasmática, o interferir en las interacciones regulatorias entre poblaciones celulares diferentes; y que el levamisol es capaz de corregir parcialmente ese defecto.

Achnowledgment: We are grateful to Dr. C. D. Pasqualini and Dr. M. A. Basombrío for assistance during the preparation of this manuscript.

References

1. Amery W: Immunopotentiation with levamisole in resectable bronchogenic carcinoma. A double blind placebo-controlled trial. *Br Med J* 3: 461, 1975.
2. Borella L, Green AA: Sequestration of PHA-responsive cells (T lymphocytes) in the bone marrow of leukemic children undergoing long-term immunossuppressive therapy. *J Immunol* 109: 927, 1972.
3. Borella L, Webster RG: The immunosuppressive effect of long-term combination chemotherapy in children with ALL in remission. *Cancer Res* 31: 420, 1971.
4. Garay GE, Pavlovsky S, Sasiain M del C, Pizzolato MA, Binztein N, Eppinger-Helf M: Immunocompetence and prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Med Ped Oncol* 2: 403, 1976.
5. Green AA, Borella L: Immunological rebound after cessation of long-term chemotherapy in ALL. II. Response to PHA and antigens. *Blood* 42: 99, 1973.
6. Hadden JW, Coffey RG, Hadden EM, López-Corrales E, Sunshine GH: Effects of levamisole and imidazole on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotide levels. *Cell Immunol* 20: 98, 1975.
7. Kazura JW, Negendank W, Guerry D, Schreiber AD: Human monocyte-lymphocyte interaction and its enhancement by levamisole. *Clin Exp Immunol* 35: 258, 1979.
8. Miyawaki T, Seki H, Moriga N, Nagaoki T, Kubo M, Okuda N, Taniguchi N: Suppression of pokeweed mitogen-induced differentiation of human B cells by in vitro levamisole-treated T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 40: 161, 1980.
9. Neveu PJ: The effects of thiol moiety of levamisole on both cellular and humoral immunity during the early response to a hapten-carrier complex. *Clin Exp Immunol* 32: 419, 1978.
10. Palacios R, Sen L, Estévez ME: Deficiencia funcional del sistema mononuclear fagocítico en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) y poliquimioterapia. *Medicina (Bs Aires)* 39: 741, 1979.
11. Pavlovsky S, Garay G, Sackmann-Muriel F, Braier L, Svarch ES: Chemoimmunotherapy with levamisole (lev) during maintenance of remission in acute lymphoblastic leukemia (ALL). A four years report. *Proc ASCO-AACR* 21: 436, 1980.
12. Rojas AF, Mickiewicz E, Feierstein JN, Olivari N: Levamisole in advanced human breast cancer. *Lancet* 1: 211, 1976.
13. Sackmann-Muriel F, Pavlovsky S, Bustelo P, Maro V, Vergara B, Eppinger-Helft M, Kvicala R, Dibar E: Alternating pulses of vincristine (VCR) + prednisone (Pred) with cytosine arabinoside (Ara-C) + cyclophosphamide (CTX) vs VCR-Pred alone in the maintenance therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Proc AACR-ASCO* 21: 435, 1980.
14. Sackmann-Muriel F, Svarch E, Eppinger-Helft M, Braier JL, Pavlovsky S, Gutman L, Vergara B, Ponzinibbio C, Failace R, Garay GE, Bugnard E, Ojeda FG, de Bellis

R, de Sijvarger SR, Saslavsky J: Evaluation of intensification and maintenance programs in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 42: 1730, 1978.
15. Sen L, Borella L: Expression of cell surface markers on T and B lymphocytes after long-term chemotherapy of acute lymphoblastic leukemia. *Cell Immunol* 9: 84, 1973.
16. Sen L, Borella L: Immunological rebound after cessation of long-term chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia. Changes in the distribution of T and B cell populations in the bone marrow and peripheral blood. *Brit J Haematol* 27: 477, 1974.
17. Simone J: Acute lymphocytic leukemia in chilhood. *Seminars in Haematology* 11: 25, 1974.
18. Simone JV, Holland E, Johnson W: Fatalities during remission of chilhood leukemia. *Blood* 39: 759, 1972.

— — — —

Discovery begins with an observation or the posing of a question. But observation is not as simple as it sounds... many look but few see. It is the exceptional person who recognizes the unusual event or manifestation. Still fewer pursue it to new understanding. Many ask questions but few have the imagination, the energy, and the overpowering drive to persist in the search for an answer, especially when this must be done in the face of difficulties and failures and even in spite of scorn from the peers.

El descubrimiento comienza con una observación o la formulación de una pregunta. Pero la observación no es una cosa tan simple como se cree... muchos miran pero pocos ven. Es la persona excepcional la que reconoce el hecho o manifestación inusual. Muchos preguntan pero pocos tienen la imaginación, la energía, el impulso dominante de perseverar en busca de una respuesta, especialmente cuando se deben afrontar dificultades y fracasos y, aún, la burla de sus pares.

MAXWELL M. WINTROBE

Blood, pure and eloquent, A story of discovery, of people and of ideas. McCraw-Hill, N. Y., 1980

 ISSN 0025-7680

LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO, CIFOESCOLIOSIS, INSUFICIENCIA RESPIRATORIA AGUDA Y UREMIA

N. B. A., H. C. Nº 54346, 22 años de edad. Autopsia 2321. Ingresó 10-1-80. Falleció 13-1-80.

Comienza en Enero de 1979 con artralgias, fiebre, astenia, eritema malar y edemas bipalpebrales y maleolares. En Julio es internada en el Hospital Vélez Sársfield, donde recibe como tratamiento 16 mg de metilprednisona, 40 mg de furosemida y 600 mg de isoniacida diariamente. Mejora parcialmente de sus edemas y artralgias, persistiendo picos febriles varios días a la semana. Dos meses más tarde reaparecen los edemas y poliartralgias, empeora su estado general y se agregan alopecía, úlceras bucales y fenómeno de Raynaud.

Es vista por consultorio externo del IIM, se efectúan análisis de laboratorio y se comprueba un hematocrito de 30 %, glóbulos blancos 2300 x mm^3 (Cay N 1, Seg N 74, Eos 1, Bas 0, Mon 2, linfocitos 22), creatinina 0.93 mg %, urea 0.50 g %, Na 143 mEq/l K 4.6 mEq/l, antinúcleo positivo, anti-DNA nativo 1/32, fenómeno LE positivo, complemento no dosable U.C.H. 50 %, ácido úrico 9.2 mg %, clearance de creatinina 81.18 ml/min, test de Coombs directo negativo, albúmina 3.31 g %, globulinas 3.59 g % (α_1 0.27, α_2 0.69, β 0.50, y γ 2.07 g %). Eritrosedimentación 56 mm en la 1ª hora. Sedimento urinario: proteínas 1 g ‰, blancos, hematíes. Continúa con igual tratamiento, sin mejoría de su estado general, refiriendo cefaleas ocasionales y visión borrosa. Persistió la fiebre, astenia y artralgias que le obligaban a permanecer en reposo en cama y edemas maleolares. Concurre nuevamente al IIM en Enero de 1980, donde se decide su internación.

Tenía como antecedentes personales de importancia, la presencia de una severa escoliosis dorsal desde los 6 años de edad, que la llevó a una importante deformidad torácica, a pesar de haber sido corregida quirúrgicamente. En los últimos meses irregularidad en los ciclos menstruales y metrorragia de escasa cantidad en los últimos 15 días

En el examen físico al ingreso, estaba lúcida, febril, onixis candidiásica en uñas de ambas manos, lesiones vesiculocostrosas peribucales. Articulaciones de codos y hombros tumefactos, calientes y dolorosos a la motilidad activa y pasiva, conjuntivas pálidas. En la auscultación pulmonar menos entrada de aire en hemitórax derecho. Auscultación cardíaca normal. Presión arterial 115/70 mm Hg. Abdomen normal. Hipotrofia muscular generalizada. Reflejos osteotendinosos normales. Fondo de ojo normal.

En los análisis de laboratorio a su ingreso se comprueba un: hematocrito de 19 %, hemoblobina 5.8 %, GB 3400/mm^3 (CayN2, Seg N: 81, Eos 2, Bas 0, Mon 3, Linfo 12), VSG 84 mm en la 1ª hora, glucemia 0.72 g ‰, urea 1.55 g ‰, Na 138 mEq/l, K 4.5 mEq/l, bilirrubina total 0.14 mg %, colesterol 138 mg %, fosfatasa alcalina 32 mU/ml, GOT 12 mU/ml, GTP 2 mU/ml, amilasa 163 mU/ml, LE positivo, Anti-DNA 1/256, complemento no dosable (en una dilución 1/50), antinúcleo positivo, látex negativo, T de Quick 97 %, PTTK 43.8 seg, plaquetas en cantidad normal, aisladas.

Radiografía de tórax: Condensación en campo inferior derecho. Escoliosis importante. Radiografía de abdomen: Riñón izquierdo de tamaño normal, el derecho no se observa. ECG: Taquicardia sinusal. QRS + 150°, trastornos difusos de la repolarización.

Evolución: Dos días después de su ingreso, aparece disnea de reposo, que va empeorando con el transcurso de las horas, hasta llegar a ortopnea, excitación, agregándose en la auscultación pulmonar roncus y sibilancias y luego rales finos y medianos bibasales.

Fue medicada con furosemida, dinitrato de isosorbide sublingual y ligadura de miembros. Se inicia simultáneamente diálisis peritoneal, apareciendo en forma simultánea depresión respiratoria, luego paro cardiorrespiratorio y fallece sin respuesta a las maniobras de reanimación.

Discusión radiológica

Dr. G. Munt: La primera radiografía muestra el pulmón izquierdo normal, y el hemitórax derecho totalmente opaco, con

— — — —

Reunión anatomoclínica efectuada en el Instituto de Investigaciones Médicas el 19-VI-81. Editores: Dres. M. A. Castro Ríos y H. J. Delisio.

el corazón en su interior. Esta puede ser una lesión adquirida, quizá por un proceso granulomatoso en el bronquio fuente que produjo una atelectasia (ver Fig. 1). Una afeción tuberculosa es muy difícil de sostener, puesto que es muy infrecuente que con esa magnitud no haya dejado alguna huella en el lado opuesto. Otra posibilidad es una lesión de tipo congénito, una hipoplasia o una agenesia del pulmón, dado que se ve bien la bifurcación de la tráquea y el bronquio fuente izquierdo, pero no se ve el bronquio derecho. Por lo tanto, es un diagnóstico a tener en cuenta. En la siguiente radiografía, que corresponde al día de la muerte, se observa una condensación parenquimatosa en la base izquierda, compatible con una neumopatía aguda. En la tomografía para ver las sombras renales, el riñón izquierdo se observa falsamente aumentado, debido a que la rotación por la escoliosis lo coloca frontalmente. El derecho, posiblemente por la distorsión que existe en los planos, no se visualiza.

Discusión clínica

Dr. L. Gagliardi: Ustedes han escuchado la historia de una mujer de 22 años que comenzó su enfermedad un año antes de su única internación en el Instituto, con rash cutáneo y fotosensibilidad. Luego se agregan otros síntomas que permiten hacer, casi con certeza, el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico, ya que además del rash malar y la fotosensibilidad que señalé, tenía artralgias, alopecía, leucopenia y fenómeno LE positivo. Presentaba, además, otros datos que no figuran en los criterios clínicos pero que avalarían el diagnóstico, como son la presencia de complemento no dosable, altos títulos de anticuerpos antiDNA, un FAN positivo y el sedimento urinario con signos de actividad de daño glomerular como son la proteinuria de un gramo en veinticuatro horas y la presencia de hematíes. Hay que hacer notar que desde el comienzo de esta enfermedad tuvo una franca actividad, y la misma estaba caracterizada por astenia, artralgias y episodios de fiebre que se controlaron sólo esporádicamente. Hace 6 meses cuando concurre a consultorio externo, una de las pocas veces que lo hizo, ya existe deterioro de la función renal y yo creo, que con una creatinina de dos miligramos y función renal progresivamente decreciente, debió haber recibido una dosis bastante mayor de corticosteroides, pero esto no pudo hacerse porque la enferma no concurría a la consulta en forma regular, de modo que su enfermedad quedó, casi diría, liberada a su evolución natural ya que la dosis de corticoides, fue, como dije, insuficiente. Cuando se interna, ignoramos lo ocurrido en esos 6 meses y a los signos de actividad lúpica ya nombrados se agrega insuficiencia renal. Esta puede deberse a una glomérulonefritis difusa, proliferativa, rápidamente evolutiva. Hay un episodio de amaurosis que es poco claro. La presencia de amaurosis con los reflejos pupilares presentes y con fondo de ojo normal en un paciente con lupus, tienen que hacer pensar que existe un compromiso retroquiasmático. Esto es bastante raro, pero, en ausencia de hipertensión arterial y de uremia debe sospecharse un trastorno vascular a nivel de la corteza occipital. Ella tenía una presión de 170/110 y uremia lo cual hace difícil adscribir a esta patogenia el síntoma amaurosis. Lo cierto es que se interna, con franca actividad y se muere en el curso de una insuficiencia respiratoria aguda en una hora. Antes de discutir los cambios pulmonares en el lupus hay que hablar de lo que ya mencionó el Dr. Mundt, la cifoescoliosis severa con un pulmón derecho que está totalmente abolido desde el punto de vista funcional, y que radiológicamente puede corresponder a una aneumatosis pulmonar. Hay que referir la dificultad, casi la imposibilidad del diagnóstico radiológico cardio-pulmonar cuando existe una cifoescoliosis grave, dado las distorsiones que ésta provoca en la anatomía torácica. Además, estos pacientes desarrollan tardíamente cor pulmonale crónico debido a hipertensión pulmonar aunque estas dos complicaciones suelen presentarse en la cuarta o quinta década de la vida, y cuando se manifiestan son junto a las infecciones pulmonares reiteradas causa de insuficiencia cardiorrespiratoria. No parece éste el caso, ya que ella está

en la 3ª década y los síntomas de insuficiencia cardíaca no son ostensibles.

Cuando ingresó con el pulmón izquierdo normal, tenía una PO_2 y una PCO_2 baja como si estuviera hiperventilando. Ahora hay que considerar lo que pasa en su pulmón derecho; como dije los pulmones en la cifoesclerosis grave tienen alteraciones de la ventilación, perfusión y estas alteraciones, con circulación conservada los lleva a una situación de aneumatosis o de atelectasia franca que de mantenerse achican el pulmón y reducen notablemente la capacidad vital y los volúmenes pulmonares. Cuando ingresó no tenía insuficiencia respiratoria ni cardíaca, y tampoco parecía tener signos de hipertensión pulmonar, ya que no existían aumento del segundo ruido, ni signos electrocardiográficos. Después de ingresar comienza con insuficiencia respiratoria aguda, y aquí hay que discutir qué le pasa al pulmón en el lupus eritematoso sistémico. El cincuenta por ciento, son variables las estadísticas, pero entre un 50 y 70 % de los lupus tienen manifestaciones pulmonares, que son de severidad y características variables; las más comunes corresponden a las pleuritis, y no parece ser éste el caso ya que no tuvo puntada de costado y no se ve derrame pleural; tampoco parece tener un pulmón encogido, ya que el pulmón izquierdo es de tamaño normal. Esto último se debe a disfunción diafragmática que perturbaría la función y el tamaño pulmonar, y tampoco parece la placa de una fibrosis intersticial ya que, salvo lo dicho, para el pulmón derecho la imagen del pulmón izquierdo era absolutamente normal. Lo que voy a considerar, y esto va a ser un ejercicio de diagnóstico diferencial, son las otras patologías pulmonares, que son el pulmón urémico, que en esencia es edema agudo de pulmón de naturaleza cardiogénica o no cardiogénica, las infecciones bacterianas que ocupan aproximadamente la mitad de toda las opacidades y de todas las condensaciones pulmonares, la neumonitis lúpica aguda y la hemorragia pulmonar. Por una razón de frecuencia y porque la imagen radiológica es del todo compatible, me es imposible no pensar que esta enfermedad haya comenzado con una bronconeumonía de tipo bacteriano agudo, del huésped comprometido ya que estaba con corticoides y uremia y por esas razones mucho más vulnerable a las infecciones bacterianas. Aunque tuviera un derrame pleural, común en el lupus debe evacuarse siempre, para descartar una etiología infecciosa. Existe un dato algo en contra de una neumopatía bacteriana aguda, que es la persistencia de la leucopenia a pesar del extenso compromiso de consolidación parcelar pulmonar, aunque la leucopenia podría deberse a un secuestro de neutrófilos en el foco infeccioso. Cuando un lupus se infecta tiene leucocitosis y éste es un hecho bastante habitual; la enferma se infectó y mantuvo su leucopenia. De modo que ese es el único dato en contra de una neumopatía infecciosa aguda, pero no excluyente. La ausencia de puntada de costado, me parece poco importante para excluir el diagnóstico; tal vez, la brusquedad de los síntomas, esté en contra de una neumonía bacteriana aguda y como principio de conducta clínica, cuando un lupus tiene una neumonía ésta es de origen bacteriano, y hay que estudiarla por medio de hemocultivos y de punciones pleurales o de punciones transtraqueales; hasta el momento, la causa es infecciosa y debe tomarse como tal. Esto es por la alta mortalidad de estos pacientes tan especiales. Lo que es bastante difícil de descartar, sobre todo en una paciente que pudo haber tenido una cardiopatía hipertensiva, que está oligúrica y que tiene retención nitrogenada, es lo que se llama neumonitis urémica y que en realidad es edema agudo de pulmón, ya sea de naturaleza cardiogénica o no, y en esto de no cardiogénica interviene fundamentalmente la sobrehidratación y la hipoproteinemia. La enferma parecía estar sobrehidratada y no tenemos datos de hipoproteinemia, estuvo oligúrica y esto es tal vez, la condición que favorece el edema de pulmón. Si bien no hay una imagen radiológica característica, el edema de pulmón se instala en el tercio medio, representa las zonas corticales, y no tiene aquí lo que suele ayudar al diagnóstico diferencial, a veces muy difícil con una neumonía bacteriana, que es el edema intersticial, o la circulación hacia arriba que en esta placa no veo, pero es impo-

sible, con los datos de la historia y la radiología, descartar esta entidad. Las otras dos situaciones que son casi idénticas y dan fallo respiratorio agudo en pacientes con actividad lúpica con anticuerpos DNA en altos títulos, y la enferma los tenía en 1/256 y en el curso de una nefropatía lúpica grave y evolutiva, son la neumonitis lúpica aguda y la hemorragia intrapulmonar, donde, las imágenes radiológicas son similares a las neumopatías agudas y al edema de pulmón, excepto que cuando son recidivantes las primeras suelen ser migratrices, y esto no lo sabemos por la falta de antecedentes y porque la enferma fallece en el primer episodio.

Los datos clínicos de que disponemos, no nos sirven porque consisten en rales, roncus, sibilancias, cianosis, disnea, en insuficiencia respiratoria y son idénticos en todas las entidades que nombré y no tenemos un dato anterior de sombras similares que hayan retrogradado con tratamiento corticoideo, que de existir son la prueba terapéutica más útil para sostener el diagnóstico de neumonitis lúpica; por supuesto los hemocultivos deben ser negativos y los exámenes bacteriológicos de punción transtraqueal también negativos para hacer este diagnóstico. Otro cuadro bastante similar, de condensación e imágenes de ocupamiento alveolar, es la hemorragia intrapulmonar. Acá el único dato fehaciente aparte de lo compatible por la búsqueda del cuadro, y la radiología acorde en una enferma con actividad lúpica muy marcada es un hematocrito muy bajo de 19 % cuando para grados de insuficiencia renal similares tenía hematocitos de alrededor de 30 %. Por supuesto que la presencia de hemoptisis nos acercaría al diagnóstico de hemorragia pulmonar, pero sólo la mitad de los pacientes con hemorragia pulmonar, de cualquier etiología, ya sea Goodpasture, arteritis o hemorragia pulmonar en lupus, tienen hemoptisis, y ello se debe a que la hemorragia es fundamentalmente intralveolar y a veces no llega a los bronquios grandes para manifestarse clínicamente como hemoptisis. Este es un cuadro dramático que lleva a la muerte a un 75 % de los pacientes, y los comentarios en la literatura son dispersos y de casos aislados, dado la rareza de esta entidad, que ya fuera descripta por Osler en 1904, donde mencionaba las complicaciones pulmonares, la hemoptisis entre ellas en el grupo "eritematoso de enfermedades de la piel" éste era el título del artículo. Esto quedó olvidado hasta 1955 cuando Baggenstoss redescubre la entidad, la jerarquiza y describe el cuadro anatómico y clínico que actualmente conocemos. Probablemente ésta sea una enfermedad, donde los complejos solubles se depositan en la membrana alveolar y también en los vasos, y por esto y otras condiciones asociadas los pacientes sangran masivamente. Hay otras posibilidades de hemorragia pulmonar y es la desencadenada por las drogas alquilantes, pero esta enferma no las recibía, y las condiciones asociadas son el tromboembolismo pulmonar y las alteraciones de la coagulación. La semana pasada vimos una hemorragia pulmonar favorecida por anticoagulantes pero hay que tener presente que estos enfermos con lupus eritematoso, tienen trombocitopatía no sólo vinculada a la uremia sino también a la enfermedad de base, pueden tener plaquetopenia y a veces están anticoagulados o tienen un anticoagulante natural, por lo cual la aparición en esos casos de hemorragia pulmonar, es factible. Pero lo cierto, es que ante un cuadro de insuficiencia respiratoria aguda e imágenes pulmonares como las descriptas se deben mencionar los cuadros que ya cité y decidirse, a falta de datos más categóricos, estadísticamente, por una neumonía bacteriana, con los reparos que ya hice.

Dr. D. E. Bernasconi: Esta paciente de veintidós años muere en insuficiencia respiratoria aguda, teniendo dos patologías que condicionan esta entidad: una es la escoliosis, y otra, el lupus eritematoso sistémico. La asociación de enfermedad pleuropulmonar y lupus son estrictamente seis entidades que ya las mencionó el Dr. Gagliardi. La más frecuente es la pleuresía con derrame, otra la atelectasia basal periférica que funciona o se desarrolla en forma análoga a las atelectasias de los postoperatorios, con dolor pleural y trastornos en la mecánica por derrame y diafragmas elevados. Otro es el edema vinculado a la dificultad en el manejo de los líqui-

dos y la hipoproteinemia. Otra la neumopatía lúpica aguda, que es un diagnóstico de exclusión, que se hace una vez que uno descartó la infección bacteriana. Con respecto al cuadro clínico de ésta, no he podido encontrar datos, pero lo que deja traslucir un artículo que consulté, es que no es un cuadro tan agudo como el de este caso, y la forma de confirmarlo es descartando la infección, y tratando a la paciente con corticoides y con drogas citotóxicas como la azatioprina[1]. Otra es la neumonitis intersticial o pulmón encogido que durante mucho tiempo se tuvo la idea que era la patología pulmonar más frecuente en el lupus, que en realidad es la menos frecuente. Y por último, el compromiso diafragmático, que también en los últimos tiempos se vio que la etiopatogenia era la miopatía diafragmática y no las adherencias pleurales como se pensaba anteriormente. Con respecto a la segunda patología que puede condicionar alteraciones pulmonares, está la escoliosis. Existen cuatro tipos de escoliosis[2], una es la idiopática, que se encuentra en un 80 % de los pacientes, comienza en la época temprana de la vida que podría ser el caso de esta enfermedad; la otra es la congénita, es la que se ve en alteraciones vertebrales, incluso ausencia de costillas y que se ve también asociado a otras defectos congénitos[3]. Es imposible descartar entre una y otra, entre la idiopática y la congénita, porque no se pueden ver con facilidad las vértebras en las radiografías, y es muy difícil inferir ausencia de costillas. Los otros dos tipos son la paralítica que se ve asociada a la enfermedad neuromuscular, principalmente la poliomelitis; y por último a defectos de tipo genético como la enfermedad de Marfan, el síndrome de Morquio, etc. O sea, que esta enferma debe haber tenido seguramente una forma idiopática o una congénita. Esto, como decía el Dr. Gagliardi, lleva a largo plazo a un cuadro de insuficiencia respiratoria y se comportan como bronquíticos crónicos con cor pulmonale. Y también tienen mayor predisposición a las infecciones. La evolución del cuadro parece el de una sepsis en un huésped inmunológicamente comprometido, con agregado de edema pulmonar por sobrehidratación e hipoproteinemia. No puedo hacer mayores especulaciones porque en realidad yo conozco el resultado de la macroscopía. Lo que voy a mencionar son las dudas que tuvimos cuando tratamos a esta enferma en el episodio de muerte. Se planteó el tromboembolismo pulmonar, si bien no se puede descartar, había datos en contra tales como ausencia de modificaciones en el electrocardiograma y otros componentes clínicos. El episodio de muerte fue tan repentino, con cambios tan agudos minuto a minuto que nos hizo pensar en ese momento que seguramente se trataba de una infección pulmonar fulminante en un huésped comprometido, con el agregado de edema pulmonar.

Dr. R. N. Garillo: Esta paciente presenta alteraciones electrocardiográficas, caracterizadas por ondas Q acentuadas en DI y aVL y alteraciones difusas del ST, hallazgos no habituales en pacientes de 22 años. Existe un electrocardiograma similar del año anterior a su ingreso, lo cual sugiere que probablemente estos cambios estén relacionados fundamentalmente a su cifoescoliosis, que sabemos puede producir alteraciones electrocardiográficas e incluso auscultatorias, produciendo el síndrome del clic-soplo. La única variación llamativa en el electrocardiograma a su ingreso, con respecto al de 1979, es la disminución del voltaje de los complejos QRS, por lo que se puede sospechar la presencia de una pericarditis. La paciente tuvo registros ocasionales de hipertensión arterial y dado el corto tiempo de evolución en una paciente joven, estimo que la misma no desempeñó ningún rol en el episodio final. La causa de muerte pudo haber sido secundaria a sobrehidratación con los trastornos pulmonares referidos. Sin embargo, se debe contemplar como otra posibilidad la instalación de una miocarditis subclínica; el único elemento de juicio es la per-

---

1. Hunninghake GW, Fauci AS: Pulmonary involvement in the collagen vascular diseases. *Am Rev Resp Dis* 119: 471, 1979.
2. Beeson P, Mc Dermott W: Textbook of Medicine, Saunders, 1975.
3. Frasel R, Paré J: Diagnosis of diseases of the chest. Saunders, 1979.

sistencia de taquicardia que no se relacionó a fiebre y/o anemia.

Dra. C. Aguirre: Desde el punto de vista renal, ya hemos comentado en otras oportunidades los distintos tipos de glomerulopatías que pueden comprometer el riñón en el lupus eritematoso sistémico: *a)* glomérulonefritis a cambios mínimos; *b*) proliferativa mesangial; *c*) proliferativa focal y segmentaria; *d)* proliferativa difusa; *e*) proliferativa difusa con características de rápidamente evolutiva; *f*) membranosa; *g*) membrano proliferativa; *h*) nefritis intersticial; *i*) necrotizante. En esta paciente con un clearance de creatinina de 80 ml/min, la presencia de un sedimento patológico con anti-DNA positivo y complemento bajo, la lesión renal puede ser compatible con una glomérulonefritis proliferativa difusa. En la necropsia probablemente encontremos signos de actividad relacionada con la presencia de anti-DNA positivo, con proliferación endocapilar asociado con necrosis fibrinoide y *wireloops*. Los depósitos de Ig son importantes e involucran la mayoría de las asas capilares periféricas y del mesangio en una localización primero subendotelial o intramembranosa; también se pueden encontrar grandes variables de cambios vasculares y túbulointersticiales y cuerpos hematoxilínicos característicos de la lesión. Aquellos que cursan con severo deterioro de la función renal, en un pequeño porcentaje, la lesión puede tener características de glomérulonefritis rápidamente evolutiva o bien presentarse como glomérulonefritis necrotizante y vasculitis diseminada. Los niveles de complemento en general no se relacionan con el grado de actividad de la lesión renal. Creo que la causa de muerte estuvo relacionada a una hemorragia pulmonar.

Dra. J. Sarano: Esta enferma reune criterios diagnósticos clínicos y de laboratorio de LES y creo que lo importante en su evolución es el compromiso pulmonar, lo que la llevó a la muerte. Como comentó previamente el Dr. Gagliardi, el compromiso pulmonar en el LES tiene una frecuencia variable entre 50 y 70 % según las distintas series, si se consideran todas las manifestaciones pulmonares como pleuritis, edema pulmonar urémico, neumonitis lúpida aguda, neumopatías secundarias a procesos infecciosos, etc. Por la rápida evolución hacia la insuficiencia respiratoria, uno podría pensar en el desarrollo de una neumonitis lúpica y hemorragia pulmonar. La neumonitis lúpica, si bien es una entidad conocida en el LES, es de difícil diagnóstico y generalmente se realiza sólo por exclusión de otras patologías más frecuentes. La hemorragia pulmonar es considerada por algunos autores en forma separada de la neumonitis lúpica aguda, pero otros piensan que podría ser la vía final común de una serie de eventos que comprometen al pulmón en el LES. Aunque el mecanismo fisiopatológico de la lesión pulmonar en el LES es desconocido, los *patterns* de injuria son muy semejantes a los que se observan en la GN lúpica asociada a depósitos de inmunocomplejos. Se observó en un estudio realizado sobre biopsias pulmonares de dos pacientes con neumonitis lúpica confirmada histológicamente, depósitos granulares de IGg, C 3 y DNA en las paredes alveolares por inmunofluorescencia. La microscopía electrónica y métodos de inmunoperoxidasa demostraron que estos depósitos se encontraban tanto en las paredes de los alvéolos como en las paredes capilares y en el intersticio pulmonar. La microelución ácida de estas mismas biopsias demostró que estos depósitos tenían actividad de DNA. Todos estos resultados fueron negativos para estudios controles (neumonitis crónica intersticial). Por lo tanto se postula que habría depósitos de complejos DNA, anti-DNA, IGg y complemento en el pulmón y que estos jugarían un rol importante en la inmunopatología de la lesión pulmonar, tal como ocurre en la glomérulonefritis lúpica por depósitos de inmunocomplejos clásica [4]. El mecanismo por el cual estos inmunocomplejos dañan

— — — —

4. Inoue T, Kanayama Y, Ohe A, Kato N, Horiguchi T, Ishii M, Shiota K: Immunopathologic studies of pneumonitis in Systemic Lupus Erithematosus. *Ann Int Med* 91: 30, 1979.

al riñón no es claro; en algunos casos estos inmunocomplejos depositados activarían al complemento determinando la liberación de aminas vasoactivas de las plaquetas y basófilos con aumento de la permeabilidad vascular, mayor depósito de inmunocomplejos y daño tisular. Además, la activación del complemento determinaría la liberación de factores quimiotácticos de los polimorfonucleares, los cuales liberarían enzimas lisosómicas que producirían daño tisular tanto en vasos como en parénquima pulmonar [5].

Dr. M. A. Castro Ríos: Como se ha escuchado, es la historia de una paciente con un LES, enfermedad que la lleva a la muerte en menos de un año y que demuestra la severidad de esta colagenopatía cuando se la deja evolucionar en su forma natural, puesto que la enferma había abandonado la medicación. Desde el punto de vista hematológico, presentaba alteraciones desde el momento de su primera consulta en el Hospital Vélez Sarsfield, y éstas empeoraron en los meses posteriores hasta su ingreso al IIM. Presentaba anemia, leucopenia, linfocitopenia, eritrosedimentación acelerada, plaquetas en cantidad y estudio de coagulación normales. La anemia, leucocitopenia y linfocitopenia, junto con los niveles de albúmina y complemento son los mejores índices de actividad lúpica y, por otra parte, la anemia y la linfocitopenia se asocian con frecuencia con lesión renal. Con respecto a los mecanismos fisiopatológicos de la leucopenia, éstos son conocidos y son múltiples: por anticuerpos antileucocitarios, por disminución de la reserva medular y además disminución del crecimiento de colonias en cultivo de médula ósea. Con respecto a la linfocitopenia está demostrado que están disminuidas las poblaciones linfocitarias B y T cuanti y cualitativamente. Con respecto a su anemia, presentaba a su ingreso un hematocrito de 19 %, índice de la severidad de la actividad lúpica. El mecanismo de la misma no parecía corresponder a una hemólisis ya que tenía una prueba de Coombs negativa y reticulocitopenia, tampoco parecía tener un hiperesplenismo, ni antecedentes de la ingesta de drogas que pudieran haber aplasiado a la médula ósea. En estos casos, la anemia es de tipo crónico simple y/o asociada a la de la insuficiencia renal; lamentablemente, no tenemos un hierro de depósito medular ni un dosaje de ferritina para poder definir si era una anemia crónica simple o una anemia ferropénica; lo cierto es que la enferma tenía ferremia baja, con saturación muy disminuida, con aumento de la proteína transportadora y esto no parece corresponder al *pattern* característico de la anemia crónica simple, sino al de la anemia ferropénica; por lo tanto si bien estos datos son incompletos, uno puede pensar que la enferma padecía una anemia ferropénica. No parecía tener pérdidas por tubo digestivo, puesto que no tenía síntomas ni antecedentes de ingesta de drogas que pudieran haber dañado la mucosa gastrointestinal. Existe en la historia la descripción de algunos episodios de metrorragia, que si bien no están consignados con demasiado énfasis, aparentemente no fueron demasiado importantes y sí de corta evolución, por lo que parece poco probable que esta ferropenia estuviera relacionada a pérdidas por vía genital. Se podría postular que esta paciente había presentado episodios previos de hemorragia pulmonar y secuestro eritrocitario con desarrollo de una anemia ferropénica y que su cuadro final fue el de una hemorragia pulmonar; pero esto no puede afirmarse, ya que no sabemos si existía una correlación de los niveles del hematocrito con el estudio del metabolismo del hierro. La Dra. Sarano se ha referido a la relación que existe entre el depósito de inmunocomplejos y hemorragia pulmonar; en realidad la fisiopatogenia de ésta no está totalmente dilucidada, ya que la mayoría de los pacientes con LES con hemorragia pulmonar en la anatomía patológica no se encuentra vasculitis en el lecho vascular pulmonar y en cambio pueden observarse depósitos de complejos sin hemorragia en otros. El estudio mencionado por la Dra. Sarano corresponde al de un grupo japonés, publicado

5. Koffler D, Schur PH, Kunkel HG: Immunological studies concerning the nephritis of Systemic Lupus Erithematosus. *J Exp Med* 126: 607, 1967.

en *Ann Int Med*, 1979, donde postulan que el depósito de los complejos inmunes es el causante de la hemorragia, descartándose fenómenos de hiperemia o coagulación intravascular; pero esto debe ser demostrado en nuevos trabajos. Con respecto a la asociación de LES e infección, la literatura es discordante. Existe la convicción entre los médicos de que esta enfermedad favorece el desarrollo de infección y esto está avalado por pruebas de laboratorio in vitro de migración y quimiotaxis leucocitaria defectuosa y por la experiencia anecdótica con respecto a infección y muerte en el LES. Los pacientes con LES que desarrollan infección, en general reciben dosis altas de corticoides y/o inmunosupresión, lo que da origen a infecciones por gérmenes oportunistas. En general, uno debe tener el consenso de que los pacientes con lupus activo tienen alterados los mecanismos de defensa y si sobreviene una infección deben tratarse simultáneamente la enfermedad de base con corticoides y la complicación con los antibióticos adecuados. La omisión de este concepto produce el fracaso terapéutico. Creo que en la anatomía patológica se va a encontrar una glomérulonefritis proliferativa lúpica difusa y en pulmón una hemorragia intraalveolar por neumonitis lúpica, aunque por orden de frecuencia es probable que una bronconeumonía haya sido la complicación que le produjo la muerte.

Discusión anatomopatológica

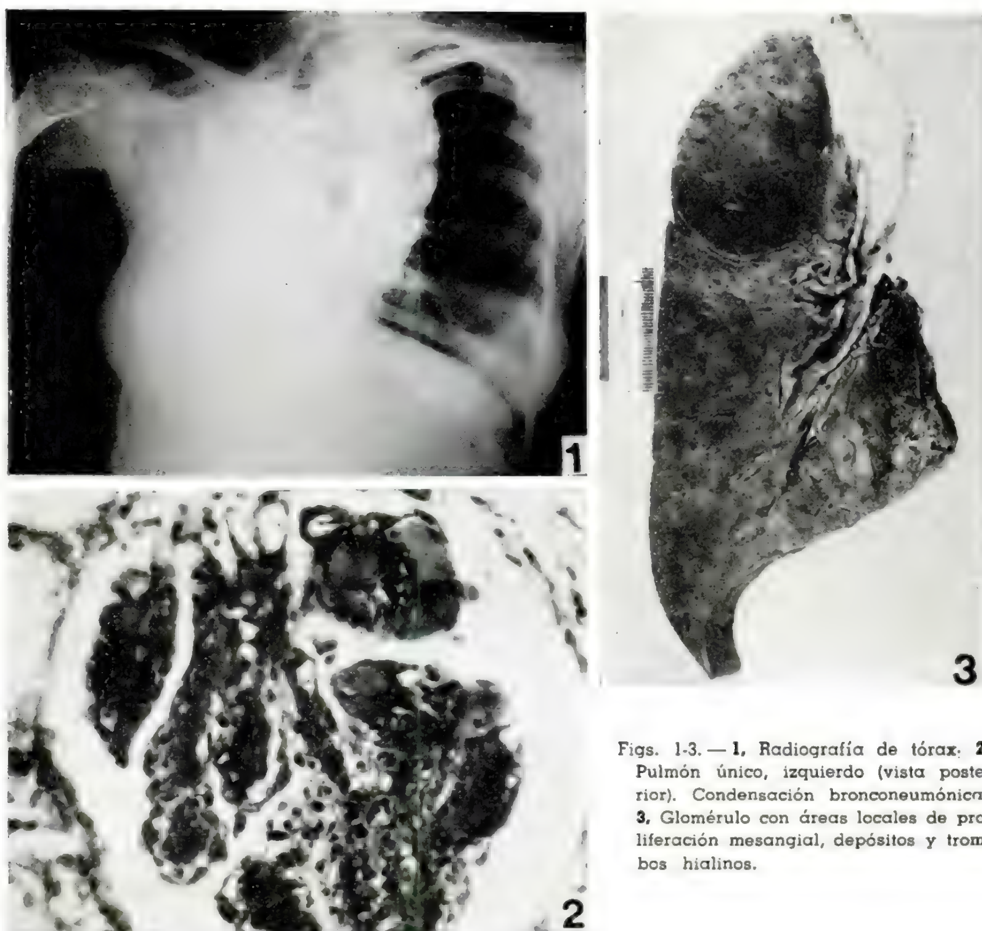
Dr. J. A. Barcat: El examen anatómico estuvo limitado a algunos órganos, puesto que la necropsia fue hecha por los residentes. Esta chica tenía un solo pulmón, el del lado izquierdo, faltaba el del lado derecho por una agenesia o aplasia (Fig. 2). El único pulmón estaba aumentado de tamaño y de consistencia y edematoso; microscópicamente tenía las lesiones de una grave bronconeumonía bacteriana, con condensación de casi todo el lóbulo inferior y también lesiones en el lóbulo superior. El corazón pesaba 255 g y, excepto la falta de arteria y venas pulmonares del lado derecho, no tenía lesiones. La aplasia o agenesia unilateral es una malformación congénita poco frecuente, es la primera que vemos entre las cerca de 3000 autopsias del Instituto. Para ustedes, que les gusta clasificar, es del grupo *a*. Esto del grupo *a* viene de la clasificación de Schneider, citada por Spencer[6], que las divide en: *a*) ausencia completa de bronquios, tejido alveolar y vasos; *b*) con bronquio rudimentario naciendo en la tráquea y sin tejido pulmonar en la punta (del bronquio), y *c*) con bronquio fuente pobremente desarrollado, rodeado por masa carnosa de tejido pulmonar mal desarrollado. Cuando hay una anomalía congénita suele haber otras, y, a la agenesia pulmonar unilateral, pueden acompañarla la persistencia del conducto arterioso, ausencia de arterias pulmonares de ambos lados y defectos septales cardíacos; en este caso no había estos acompañantes, pero los residentes sólo sacaron un riñón y creo que sólo había uno.

Dr. D. E. Bernasconi: Sí, tenía un solo riñón y del mismo lado donde había pulmón; faltaba el riñón del lado derecho. La escoliosis congénita puede estar acompañada con falta de órganos, podría ser el caso.

Dr. J. A. Barcat: Podría ser el caso, pero en la lista de malformaciones que acompañan a la aplasia pulmonar no está la escoliosis. El único riñón, entonces, pesaba 380 g, y microscópicamente se encontraron las lesiones de una nefritis lúpica activa con depósitos subendoteliales, mesangiales, trombos hialinos y áreas locales de cambios proliferativos; en síntesis, una glomérulonefritis difusa proliferativa, Clase IV de Appel et al.[7] (Fig. 3). Una muestra de hígado mostró transformación grasa microvacuolar y en bazo se halló

---

6. Spencer H: Pathology of the Lung. Vol I, p 71, Permamon Press, Oxford, 1977.
7. Appel GB, Silva FG, Pirani CL, Meltzer JI: Estes D: Renal involvement in Systemic Lupus Erithematosus (SLE). *Medicine* 57: 371, 1978.



Figs. 1-3. — **1.** Radiografía de tórax; **2.** Pulmón único, izquierdo (vista posterior). Condensación bronconeumónica; **3.** Glomérulo con áreas locales de proliferación mesangial, depósitos y trombos hialinos.

depleción linfocitaria. En síntesis, la causa de la muerte fue la grave infección pulmonar, la enfermedad principal el lupus eritematoso sistémico con nefropatía difusa activa y varias anomalías congénitas: agenesia de pulmón derecho, agenesia de riñón derecho y tal vez la escoliosis.

Diagnóstico anatómico (A 2321)

1) *Lupus eritematoso sistémico con glomérulonefritis difusa proliferativa (Clase IV, Appel et al.), glomérulonefritis lúpica activa con depósitos subendoteliales, mesangiales y trombos hialinos. Bronconeumonía grave en pulmón único. Transformación grasa hepática microvacuolar. Embolias de médula ósea. Estasis pulmonar.*

2) *Aplasia o agenesia de pulmón y riñón derechos. Escoliosis (clínico y radiológico).*

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 485-498 (1981)

PREVENCION DE LA TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA Y EL TROMBOEMBOLISMO PULMONAR

A. ZIELINSKY *, J. HIRSH

Department of Pathology, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

Cerca de 100 000 pacientes hospitalizados mueren cada año en los Estados Unidos como consecuencia de una embolia pulmonar masiva [25]. La mayoría de los episodios fatales ocurren en enfermos terminales, pero una proporción significativa ocurre en individuos que de no mediar una complicación tromboembólica hubieran gozado de una vida normal [23]. La embolia pulmonar masiva está frecuentemente asociada a la trombosis venosa subclínica [25] siendo el episodio embólico muchas veces la primera manifestación de la enfermedad tromboembólica. Estudios epidemiológicos han permitido identificar ciertos factores clínicos de riesgo para la enfermedad tromboembólica. Estos incluyen: edad avanzada, historia tromboembólica previa, cáncer, insuficiencia cardíaca, reposo prolongado en cama, parálisis, obesidad y varicosidades. Determinados procedimientos quirúrgicos como la cirugía de cadera y rodilla traen aparejado un alto riesgo tromboembólico en el período postoperatorio.

Existen fundamentalmente dos enfoques para la prevención del tromboembolismo pulmonar fatal. Estos son: la detección precoz de la trombosis venosa subclínica mediante la utilización de técnicas no invasoras de diagnóstico, como el *scanning* con fibrinógeno ^{125}I. El reconocimiento de ésta permite el tratamiento anticoagulante temprano para prevenir el crecimiento del trombo y subsecuente embolización. La segunda alternativa es la prolilaxis primaria, utilizando drogas o métodos físicos para la prevención de la trombosis venosa profunda. El uso de métodos profilácticos es probablemente más efectivo y menos costoso.

El objetivo fundamental de la profilaxis es la prevención del embolismo pulmonar fatal. Otros objetivos secundarios incluyen la prevención del embolismo pulmonar menor y de la trombosis venosa, ya que ambas son causas de morbilidad que requieren tratamiento anticoagulante y prolongan la estadía hospitalaria. El método de prevención ideal debe ser: seguro, asociado a un mínimo de efectos secundarios, aceptado por pacientes y médicos, de fácil administración, debe ser económicamente accesible y su utilización debe requerir un mínimo monitoreo de laboratorio. Antes de considerar los métodos de prevención disponibles, es necesario mencionar los aspectos fisiopatológicos más sobresalientes en el desarrollo de la trombosis venosa. Esta se inicia como depósitos de plaquetas, fibrina y hematíes en los sacos valvulares de las venas musculares de la pierna, por ser éstos focos de rémora sanguínea. El crecimiento del trombo ve-

Recibido: 18-III-1981. Aceptado: 8-IV-1981.

* Becario de la Ontario Heart Foundation.

Dirección postal: St. Joseph's Hospital, Coagulation Laboratory, 50 Charlton Ave. E., Hamilton, Ontario, Canada.

noso trae aparejado obstrucción del flujo sanguíneo y como consecuencia mayor rémora venosa y crecimiento proximal y distal del coágulo con depósito de fibrina y glóbulos rojos.

Los mecanismos responsables en la patogénesis de la trombosis venosa son: la estasis venosa, la activación de la coagulación sanguínea y el daño del endotelio vascular. Los métodos de profilaxis que han sido clínicamente evaluados han sido dirigidos a uno o más de los factores patogénicos. Estos incluyen: métodos mecánicos que previenen el enlentecimiento sanguíneo; los anticoagulantes, los cuales interactúan frenando la activación del mecanismo de la coagulación, y finalmente drogas que suprimen la función plaquetaria y su interacción con la pared vascular dañada.

El conocimiento de ciertos aspectos metodológicos es de fundamental importancia en la evaluación de los resultados de los numerosos estudios clínicos publicados [45]. Los ensayos clínicos deben ser prospectivos, con un grupo control concurrente y los pacientes deben ser distribuidos al azar, utilizando los diversos métodos de randomización disponibles, para evitar interferencias subjetivas en la selección de los enfermos. Idealmente el estudio debe ser doble ciego y de no ser posible, la interpretación de los resultados debe ser realizada por un observador que no tenga conocimiento alguno acerca de las categorías terapéuticas utilizadas. Los grupos deben ser comparables en lo que se refiere a importantes factores pronósticos.

Los parámetros establecidos para la evaluación de los resultados deben ser objetivos. En este caso habrá dos puntos finales posibles, la trombosis venosa y embolia pulmonar. Para el diagnóstico de la primera deberá tenerse en cuenta la falibilidad del diagnóstico clínico, por ser poco sensible e inespecífico siendo, por lo tanto, inapropiado como parámetro final en la evaluación de un estudio. Las técnicas auxiliares de diagnóstico permiten evaluar objetivamente los resultados [107]. Estas incluyen: el *scanning* con fibrinógeno marcado, la venografía y la pletismografía por impedancia eléctrica.

La embolia pulmonar ofrece consideraciones similares. El diagnóstico clínico es impreciso, siendo los métodos auxiliares de diagnóstico necesarios para la evaluación objetiva de los resultados. Estos son: el *scanning* por ventilación/perfusión pulmonar y la angiografía pulmonar. Los estudios necrópsicos son de utilidad si se utilizan criterios definidos.

En la presente revisión de la literatura, sólo habrán de considerarse estudios que hayan utilizado métodos aceptables de randomización, los cuales incluyeron un grupo control y que hayan empleado métodos objetivos para la evaluación de los parámetros diagnósticos.

Anticoagulantes orales

Numerosos estudios han sido realizados para la evaluación de las drogas dicumarínicas en la prevención de la trombosis venosa en enfermos de riesgo. Sólo siete estudios sobre un total de más de veinte publicados, contaron con un grupo control y métodos objetivos de diagnóstico. Tres de los estudios incluyeron embolia pulmonar fatal confirmada por estudio necrópsico como punto final en la evaluación del ensayo clínico. Los resultados coinciden en otorgar una reducción en la frecuencia de embolia pulmonar fatal con el uso de anticoagulantes orales (Tabla 1).

En el clásico estudio de Sevitt y Gallagher [94] también es de mencionar una disminución significativa en la mortalidad total, hallazgo éste de suma importancia ya que hasta el momento las drogas dicumarínicas son el único método de prevención de la enfermedad tromboembólica que ha demostrado reducir la mortalidad postoperatoria. Pese a lo cual ha sido estimado que sólo un 3 % de los cirujanos en el Reino Unido (donde dicho estudio fue realizado) utilizan anticoagulantes orales para la prevención de problemas tromboembólicos [64]. Los estudios que utilizaron venografía como método diagnóstico mostraron igualmente una significativa reducción en el número de complicaciones trombóticas [10, 39].

Los únicos estudios que no encontraron beneficio alguno en la utilización de drogas dicumarínicas fueron aquellos que utilizaron el *scanning* con fibrinógeno marcado para el diagnóstico de la trom-

TABLA 1. — *Anticoagulantes orales en la prevención del tromboembolismo venoso en pacientes sometidos a cirugía de cadera electiva y de emergencia*

Autores	Cirugía	Punto final	Pacientes					
			Tratados			No tratados		
			Nº	TVP %	EP fatal %	Nº	TVP %	EP fatal %
Sevitt [94]	fractura cadera	autopsia	150	14	1.3	150	83	10
Eskeland [33]	,,	,,	100	—	1	100	—	7
Borgstrom [10]	,,	venografía	29	9.5	—	29	56.5	—
Hamilton [39]	,,	,,	38	26	—	38	49	—
Pinto [74]	,,	*scanning*	25	36	—	25	32	—
Morris [65]	,,	autopsia	75	31	0	74	68	8
Hume [46]	electiva	*scanning*	17	59	—	19	42	—

TVP: trombosis venosa profunda; EP: embolia pulmonar.

bosis venosa profunda [46, 74]. El método radioisotópico tiene una alta sensibilidad para la detección de pequeños trombos en los plexos venosos de la pantorrilla. Aparentemente los anticoagulantes orales no previenen el desarrollo de estos trombos que aparecen en los primeros días del período postoperatorio cuando la depresión de los factores K-dependientes aun no han alcanzado niveles terapéuticos.

Complicaciones hemorrágicas

La incidencia de hemorragia es variable. Dicha variabilidad en la incidencia de las complicaciones hemorrágicas puede ser explicada por diferencias en la calidad del control de laboratorio y la intensidad del efecto anticoagulante deseado. Estos estudios indican que cuando el tiempo de protrombina es mantenido tres veces por sobre los tiempos normales, el riesgo hemorrágico aumenta considerablemente [95]. En conclusión, los anticoagulantes orales han demostrado ser efectivos en la prevención de la trombosis venosa clínicamente significativa, la embolia pulmonar y en la reducción de la mortalidad postoperatoria. Su utilización está asociada a un riesgo ligeramente aumentado de hemorragia que puede ser disminuido significativamente de mediar un adecuado control de laboratorio.

Heparina T

1) *Profilaxis con dosis terapéuticas de heparina:* Wright en 1948, fue el primero en reportar resultados positivos con heparina seguida de anticoagulantes orales [105]. Su estudio tiene valor histórico, ya que utilizó el diagnóstico clínico para la evaluación de la trombosis venosa y la embolia pulmonar. Dos estudios randomizados utilizaron fibrinógeno marcado para el diagnóstico de la trombosis venosa en enfermos con infarto de miocardio [41, 104]. La dosis de heparina fue la suficiente como para prolongar el tiempo de coagulación de 2 ½ a 3 ½ el tiempo normal. La vía de administración fue endovenosa en forma continua por dos semanas. La incidencia de trombosis fue reducida de 29 % a 0 % en el grupo con heparina. El segundo estudio [104] sólo utilizó la vía endovenosa por 48 horas, seguida de anticoagulantes orales con resultados similares. En ambos estudios las complicaciones hemorrágicas fueron mínimas.

Por lo tanto, una dosis terapéutica de heparina seguida de anticoagulantes orales es un método efectivo de prevención en enfermos con patología médica sin mediar contraindicaciones para la terapéutica anticoagulante.

2) *Profilaxis con mini dosis de heparina por vía subcutánea:* De Takats en 1950 [30] sugería que dosis más bajas de heparina son necesarias para la prevención de trombosis que para impedir su extensión una vez formada.

La heparina actúa formando un complejo con una α_2 globulina plasmática con actividad inhibidora del factor X ac-

tivado, denominada antitrombina III. Aunque el mecanismo aun no ha sido totalmente dilucidado, Rosenberg [82] postula que la heparina se une a la antitrombina III aumentando la reactividad de este inhibidor natural contra factores activados de la coagulación, incluyendo la trombina. Estos poseen en común el hecho de ser enzimas cuyo centro activo es el aminoácido serina (serino-proteasas). La eficacia de la heparina subcutánea ha sido extensamente evaluada en pacientes sometidos a diversos procedimientos quirúrgicos.

Cirugía abdómino-torácica

Un total de quince estudios prospectivos, randomizados, doble ciego, satisfacen las condiciones previamente estipuladas para el análisis de los estudios publicados. En todos el punto final fue la detección de trombosis venosa mediante el *scanning* con fibrinógeno ^{125}I (Tabla 2). La primera dosis de heparina fue suministrada dos horas antes de la intervención quirúrgica y la dosis postoperatoria fue de 5000 unidades cada 8 o 12 horas. Seis de los ocho estudios que utilizaron el régimen de heparina cada 12 horas mostraron una reducción estadísticamente significativa en la incidencia de trombosis venosa. Todos los estudios realizados con heparina administrada cada 8 horas fueron efectivos en cuanto a prevención de trombosis venosa detectada radioisotópicamente. Seis estudios utilizaron la embolia pulmonar como parámetro final de evaluación (Tabla 3). Cinco de los 6 estudios fueron positivos. El estudio más importante fue, sin duda, el Internacional Multicéntrico [49]. En este estudio están incluidos 4121 pacientes mayores de 40 años que fueron sometidos a diversos procedimientos quirúrgicos. El punto final fue la embolia pulmonar fatal diagnosticada por estudio necrópsico. La embolia pulmonar fue clasificada como fatal si ésta involucraba el tronco pulmonar, la arteria pulmonar o al menos dos arterias lobares y si no había otra causa aparente de muerte. En este estudio hubo 100 muertes en el grupo control y 80 en el grupo que recibió heparina. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Este estudio no fue doble ciego, aunque los estudios necrópsicos fueron realizados por patólogos que desconocían el grupo al cual el enfermo pertenecía.

Dieciséis de 2076 (0.8 %) pacientes en el grupo control fallecieron de una embolia pulmonar fatal y 2 de 2076 (0.1 %) en el grupo tratado. Esta diferencia fue estadísticamente significativa.

Sobre la base de estos resultados, un régimen con heparina subcutánea ha sido ampliamente recomendado para la prevención de la enfermedad tromboembólica en enfermos de más de 40 años sometidos

TABLA 2. — *Heparina subcutánea en la prevención de trombosis venosa profunda en pacientes sometidos a cirugía general*

Autores	Dosis	Frecuencia de trombosis	
		Tratados	No tratados
Gordon-Smith [36]	5000 cada 12 horas	4/ 48 (8 %)	21/ 50 (42 %)
Kakkar [51]	" " " "	3/ 29 (8 %)	17/ 39 (42 %)
Nicolaides [69]	" " " "	1/122 (1 %)	29/122 (29 %)
Ballard [6]	" " " "	2/ 55 (4 %)	16/ 55 (29 %)
Lahnborg [58]	" " " "	3/ 58 (5 %)	11/ 54 (20 %)
Scottish study [92]	" " " "	15/128 (12 %)	47/128 (37 %)
Abernethy [2]	" " " "	4/ 63 (6 %)	3/ 62 (5 %)
Covey [24]	" " " "	4/ 53 (7 %)	5/ 52 (10 %)
Rosenberg [83]	5000 cada 8 horas	4/ 55 (7 %)	39/ 89 (44 %)
Gallus [35]	" " " "	13/362 (4 %)	66/412 (16 %)
Rem [77]	" " " "	11/ 83 (13 %)	34/ 95 (36 %)
Multicéntrico [49]	" " " "	48/625 (8 %)	164/667 (25 %)
Gruber [38]	" " " "	12/ 94 (13 %)	36/100 (36 %)

TABLA 3. — *Heparina subcutánea en la prevención de embolia pulmonar*

Autores	Punto final	Frecuencia de embolia pulmonar					
		Tratado			No tratado		
		Nº	EP total	EP fatal	Nº	EP total	EP fatal
Lahnborg [58]	*scanning* perfusión postoperatorio	58	9 (16 %)	—	54	24 (44 %)	—
Abernethy [2]	"	21	0	—	26	5 (19 %)	—
Kiil [54]	" y (autopsias)	643	1 (0.1 %)	1	653	16 (2 %)	4 (0.6 %)
Multicéntrico [49]	EP fatal (autopsia)	2045 (80) *	5	2 (0,1 %)	2076 (100) *	22	16 (0.77 %)
Sagar [88]	"	156 (14) *	?	0	144 (18) *	?	6 (4 %)
Groote Schuur [37]	*scanning* perfusión autopsia	100	5 (5 %) †	1	99	5 (5 %) †	0

* Nº de pacientes que fallecieron; † Diagnóstico inequívoco de EP.

a cirugía general. Sin embargo, aun subsiste la controversia fundamentalmente relacionada con la falla en demostrar un efecto sobre la mortalidad general. Una de las razones implicadas es la temprana terminación del estudio Multicéntrico al demostrarse una diferencia significativa en las muertes debidas a embolia pulmonar. El estudio de Groote Schuur [37], recientemente publicado, ha sido objeto de numerosas críticas, relacionadas al limitado número de enfermos incluidos y a la metodología de evaluación de los resultados [53, 76].

La heparina subcutánea también ha demostrado su efectividad en pacientes sometidos a cirugía oncológica, aunque la reducción en la incidencia de trombosis no fue tan marcada como en el resto de los pacientes quirúrgicos [78]. Finalmente, la incidencia de trombosis venosa femoropoplítea fue reducida en forma significativa en la mayoría de los estudios publicados.

Complicaciones hemorrágicas

Las complicaciones hemorrágicas fueron evaluadas en forma prospectiva en siete estudios [35, 36, 49, 51, 58, 69, 92]. Ninguno de éstos evaluó la incidencia de hemorragia con un diseño doble ciego, por lo tanto estos estudios pueden ser criticados en este aspecto. En cuatro de los siete estudios no hubo diferencia alguna en la incidencia de hemorragia entre el grupo control y el grupo tratado. En uno de los estudios, hubo una mayor incidencia de hemorragias fatales [73]. En el estudio Multicéntrico hubo una incidencia levemente aumentada en el sangrado postoperatorio y en la formación de hematomas [49].

Cirugía prostática

Los estudios que evaluaron la heparina subcutánea en enfermos sometidos a cirugía prostática muestran resultados conflictivos. Dos estudios con aproximadamente 25 enfermos en cada grupo, muestran resultados opuestos [13, 14]. Un estudio en el cual se evaluó este método de profilaxis *versus* el uso de botas de compresión neumática intermitente, mostró resultados negativos para el grupo que recibió heparina [22]. Un estudio reciente, doble ciego, con un número limitado de enfermos, encontró que la administración de heparina redujo la incidencia de trombosis de 42 a 6 % [57]. En otros tipos de cirugía urológica, la profilaxis con heparina mostró resultados efectivos [51].

Cirugía ortopédica

Hubo nueve estudios randomizados que evaluaron la eficacia de la heparina subcutánea en la prevención de tromboembolismo en pacientes sometidos a cirugía electiva de cadera. Los resultados son inconsistentes, algunos mostraron beneficio

TABLA 4. — ***Heparina subcutánea en la prevención del tromboembolismo venoso en pacientes sometidos a cirugía electiva de cadera y de emergencia (fractura de cuello de fémur)***

Autores	Régimen	Intervalo (hs)	Duración (días)	DVT % Tratado	DVT % No tratado
Cirugía electiva:					
Morris [63]	5000	12	10	11	50
Hampson [40]	,,	8	10	46	54
Dechavanne [28]	,,	8	10	7	48
Hume [46]	,,	8	?	33	42
Harris [42]	,,	8	?	73	—
VT Study group [101]	,,	8	10	5	37
Evarts [32]	,,	12	10	28	—
Moskovitz [66]	,,	8	7	23	59
Fractura de fémur:					
Gallus [34]	,,	8	7	13	48
Kakkar [51]	,,	12	7 +	40	—
Moskovitz [66]	,,	8	20	41	39

y otros mostraron resultados negativos (Tabla 4). Sólo dos estudios fueron doble ciego [40, 66]. Cinco estudios evaluaron prospectivamente el posible desarrollo de complicaciones hemorrágicas [40, 42, 51, 54, 58].

De los estudios doble ciego, el de Moskovitz y col. [66] mostró una significativa reducción en el número de complicaciones tromboembólicas e incluso el número de trombosis femoropoplíteas. Sin embargo, el estudio reportado por Hampson [40] mostró resultados negativos. Un tercer estudio doble ciego, que utilizó la combinación de heparina subcutánea y sulfipirazona redujo la incidencia de complicaciones trombóticas, pero la diferencia con el grupo control no fue estadísticamente significativa [81]. Los estudios prospectivos, randomizados que no fueron doble ciego igualmente muestran resultados inconsistentes. Uno de los problemas en la interpretación de los resultados de los estudios publicados, es debido al hecho que venografías de rutina no fueron realizadas en todos los enfermos; por lo tanto la incidencia de trombosis venosa femoral, contigua al área de trauma quirúrgico, hallazgo éste que no es infrecuente en cirugía de cadera, fue subestimada. Debido a esto, no se pueden arrojar conclusiones definitivas sobre los resultados publicados y es probable que la protección que la heparina subcutánea pueda brindar en este tipo de cirugía sea incompleta.

En pacientes con fractura de cuello de fémur sometidos a cirugía de emergencia de cadera, igualmente los resultados de los estudios realizados no muestran beneficio con el uso de heparina [51, 66]. Algunos estudios mostraron una aparente reducción en el número de trombosis, pero únicamente limitado al desarrollo de trombosis venosa de pantorrilla. Respecto de las complicaciones, dos estudios mostraron que no hubo una excesiva tendencia hemorrágica [63, 101], pero en cuatro estudios restantes, una mayor incidencia de hematomas en el área quirúrgica fue observada [28, 34, 42, 46].

En conclusión, la utilización de heparina subcutánea en enfermos sometidos a cirugía de cadera electiva o de emergencia, no ha demostrado la misma efectividad que en enfermos sometidos a cirugía abdómino-torácica y está asociada al desarrollo de hematomas en el área quirúrgica.

Métodos físicos

La asociación entre inmovilidad y estasis sanguíneo ha sido demostrada en numerosos estudios [12, 31, 70]. Estos métodos al aumentar el flujo venoso de retorno de miembros inferiores previenen la rémora sanguínea. Existen diversas modalidades de métodos diseñados para aumentar el flujo venoso. Estos incluyen: medias elásticas, elevación de los miem-

bros inferiores, fisioterapia, estimulación eléctrica de los músculos de la pantorrilla y métodos de compresión neumática intermitente.

Métodos físicos simples

Varios métodos han sido evaluados: ambulación precoz, elevación de miembros inferiores, fisioterapia y medias elásticas. Ninguno utilizado en forma aislada redujo significativamente la incidencia de trombosis venosa profunda asociada a cirugía [15, 84, 85]. Sin embargo, la combinación de medias elásticas, fisioterapia y elevación de miembros inferiores fue efectiva, aunque este estudio incluyó un número limitado de enfermos [98].

Un estudio publicado recientemente [93], mostró resultados favorables con el uso de medias que ejercen una presión graduada, produciendo un efecto hemodinámico superior en el drenaje venoso de miembros inferiores.

Estimulación eléctrica

Esta técnica incluye dos electrodos que son colocados sobre la piel de la pantorrilla y muslo. El flujo venoso aumenta mediante la contracción de los músculos estimulados eléctricamente. Son estímulos de 50 milisegundos que son repetidos 12 a 15 veces por minuto.

La mayoría de los estudios que evaluaron este método realizaron un seguimiento postoperatorio corto en pacientes con mediano riesgo tromboembólico. Por lo tanto, los resultados, aunque promisorios, no pueden ser extrapolados a pacientes con alto riesgo que deben permanecer en cama en forma prolongada [13, 29, 83].

Compresión intermitente

Esta técnica es sin duda la más efectiva de las hasta ahora evaluadas. La contracción muscular es estimulada mediante una bota neumática que ejerce presión sobre pies y pantorrillas. Dos tipos de ciclos de compresión han sido utilizados. Un ciclo rápido, con un período de compresión de 5 segundos seguidos por un intervalo de reposo de 60 a 100 segundos. El ciclo lento utiliza períodos de compresión de hasta 1 minuto, seguidos de un intervalo de tiempo similar. Este método es simple, no invasor, relativamente económico, no produce dolor y no está asociado a complicaciones hemorrágicas.

La compresión intermitente de los músculos de la pantorrilla no sólo aumenta el flujo femoral sino que también aumenta la actividad fibrinolítica sistémica. En este sentido, es interesante mencionar que la compresión intermitente de una extremidad superior, produjo una reducción en la incidencia de trombosis detectada por *scanning* con fibrinógeno marcado en pacientes sometidos a cirugía general [56].

La mayoría de los estudios mostraron resultados positivos. Uno de los inconvenientes con esta tecnología es que el beneficio se extiende mientras las botas permanezcan en uso. En la mayoría de los casos, éstas fueron utilizadas por períodos cortos de tiempo hasta de una semana. Un estudio reciente mostró beneficio prolongado en enfermos sometidos a cirugía urológica, siendo las botas utilizadas únicamente durante la cirugía y el primer día postoperatorio [91].

Los estudios publicados por Turpie y Skillman [96, 99] son de particular interés, ya que estos autores mostraron que las botas inflables son efectivas en pacientes sometidos a intervenciones neuroquirúrgicas, donde la utilización de heparina es riesgosa. Los resultados con este método de profilaxis son sumamente auspiciosos, aunque hasta el presente no ha habido estudios que demuestren una reducción en la incidencia de embolia pulmonar (Tabla 5).

Dextrán

Dextrán es un polímero de glucosa que fue introducido como expansor de volumen y subsecuentemente evaluado como agente antitrombótico. Los dos tipos más utilizados son el Dextrán 70 y el Dextrán 40. Aparentemente, no hay diferencias en cuanto a eficacia entre los dos tipos de dextranos [5, 26].

Las propiedades antitrombóticas pueden ser atribuidas a varias acciones: *a)* disminución de la viscosidad sanguínea; *b)* reducción de la reactividad plaqueta-

TABLA 5. — *Botas de compresión intermitente en la prevención de trombosis venosa en pacientes quirúrgicos*

Autores	Tipo de cirugía	Trombosis venosa	
		Tratados	No tratados
Sabri [86]	General	2/39 (5 %)	12/ 39 (31 %)
Hills [44]	,,	7/70 (10 %)	23/ 70 (33 %)
Roberts [79]	,,	6/94 (6 %)	27/104 (26 %)
Clark [21]	,,	0/36 (0 %)	7/ 36 (19 %)
Skillman [96]	Neurocirugía	4/47 (8.5 %)	12/ 48 (25 %)
Turpie [99]	,,	1/53 (2 %)	9/ 69 (18 %)
Coe [22]	Urológica	2/29 (7 %)	6/ 24 (25 %)
Hull [48]	Rodilla	2/32 (6 %)	19/ 29 (65.5 %)
McKenna [61]	,,	1/10 (10 %)	9/ 12 (75 %)

ria frente al endotelio vascular dañado; *c)* inhibición de la agregación plaquetaria, y *d)* susceptibilidad aumentada del coágulo de fibrina formado en presencia de dextranos a la fibrinólisis [1, 75, 103].

Los resultados en cirugía general y ginecológica son conflictivos (Tabla 6). En seis estudios que utilizaron fibrinógeno marcado como punto final en la evaluación de este método profiláctico, el Dextrán fue administrado antes de la cirugía y en el período postoperatorio por distinta extensión de tiempo y en distintas dosis. Tres mostraron efectividad [8, 9, 17] y los otros estudios fueron negativos [7, 55, 92].

Por el contrario, en cirugía ortopédica la utilización de dextranos ha sido consistentemente efectiva en la reducción de trombosis venosa. Esta diferencia entre los resultados en la cirugía ortopédica y la general abdómino-torácica puede ser debida a dos factores: el primero es que la droga fue administrada por un período de tiempo más prolongado en enfermos ortopédicos; el segundo, es que en los estudios de evaluación en enfermos ortopédicos la venografía fue utilizada en lugar de fibrinógeno marcado.

Efectos secundarios

El mayor inconveniente en la utilización de Dextrán está relacionado con su capacidad expansora de volumen, lo que puede resultar en descompensación cardíaca particularmente en enfermos de edad avanzada. Reacciones alérgicas han sido comunicadas pero son infrecuentes. Otras de las limitaciones es su costo, que es relativamente elevado y el hecho que debe ser administrado por vía endovenosa.

Drogas antiplaquetarias

Aspirina: La mayoría de los estudios publicados han sido criticados por su me-

TABLA 6. — *Dextrán en la prevención de trombosis venosa en pacientes quirúrgicos*

Autor	Tipo de cirugía	Punto final	Trombosis venosa	
			Tratados	No tratados
Bonnar [8]	Ginecológica	*scanning*	1/120 (0.8 %)	15/140 (11 %)
Carter [17]	General	,,	1/106 (0.9 %)	10/101 (10 %)
Becker [7]	Colecistectomía	,,	13/ 42 (31 %)	11/ 35 (31 %)
Scottish [92]	General, Ginecol.	,,	32/128 (25 %)	47/128 (37 %)
Kline [55]	General	,,	20/ 94 (21 %)	32/121 (26 %)
Ahlberg [3]	Fractura cadera	venografía	5/ 39 (13 %)	13/ 25 (52 %)
Johnsson [50]	,, ,,	,,	1/ 27 (4 %)	16/ 45 (36 %)
Myhre [67]	,, ,,	,,	11/ 55 (20 %)	22/ 55 (40 %)
Evarts [32]	Electiva cadera	,,	5/ 29 (26 %)	10/ 20 (50 %)

todología. Los estudios con un adecuado diseño muestran resultados conflictivos. O'Brien [72] utilizando dosis de 2400 mg diarios no encontró beneficio alguno. El estudio del British Medical Research Council [62] empleando dosis más bajas de aspirina igualmente encontró resultados negativos en pacientes sometidos a cirugía general.

Clagett y col. [20] con dosis de 1300 mg diarios encontraron una moderada reducción en la incidencia de trombosis detectada radioisotópicamente, aunque la diferencia con el grupo control no fue estadísticamente significativa.

Los estudios realizados en cirugía de cadera arrojan resultados similares. Un estudio encontró que el grupo que recibió aspirina desarrolló trombosis en un 80 % de los casos [97].

Los estudios de Harris y col. [43] han encontrado el uso de aspirina efectivo en pacientes sometidos a cirugía electiva de cadera. Resultados positivos fueron encontrados en varios estudios realizados por estos autores [20, 42, 43]. La utilización de aspirina en una dosis de 600 mg dos veces por día, redujo la incidencia de trombosis venosa detectada por venografía, de 56 % al 17 %. Este efecto sólo fue demostrado en hombres, lo que constituye una limitación de por sí.

En el estudio de Zekert y col. [106], el uso de 500 mg de aspirina tres veces por día redujo la incidencia de embolia pulmonar fatal en pacientes con fractura de cuello de fémur. Este estudio tuvo un diseño adecuado aunque se lo ha criticado por la falta de un criterio específico para el diagnóstico de embolia pulmonar fatal en el estudio necrópsico.

McKenna y col. [61] realizaron un estudio con tres grupos terapéuticos y un grupo control en pacientes sometidos a reemplazo total de la articulación de la rodilla. Los enfermos fueron randomizados entre: bajas dosis de aspirina (960 mg diarios), altas dosis de aspirina (3600 mg diarios), botas de compresión intermitente y un grupo control. Dosis bajas de aspirina no fueron efectivas, mientras que una dosis alta de esta droga y el dispositivo mecánico, mostraron un beneficio que fue estadísticamente significativo.

Hidroxicloroquina: Esta droga ha sido evaluada en pacientes sometidos a cirugía abdómino-torácica y ortopédica. Carter y col. [18] encontraron que la hidroxicloroquina en dosis de 800 mg diarios redujo significativamente la incidencia de trombosis venosa radioisotópica.

Chrisman [19] utilizando dosis de 600 mg en pacientes sometidos a cirugía de cadera y rodilla, demostró una reducción en la incidencia de trombosis venosa proximal. Hume [47], por el contrario, encontró esta droga inefectiva en pacientes sometidos a cirugía ortopédica.

La utilización de hidroxicloroquina para la prevención de la enfermedad tromboembólica muestra resultados promisorios, pero aun no ha habido estudios que hayan demostrado protección para el desarrollo de embolismo pulmonar.

Combinación de drogas

Heparina y dehidroergotamina: Esta combinación tiene efectos sinergísticos y ha demostrado ser beneficiosa en pacientes sometidos a cirugía de cadera [52, 89]. Sagar realizó solamente *scanning* con fibrinógeno radioactivo, mientras que Kakkar y col. investigaron todos los pacientes con venografía. Estos estudios incluyeron un número limitado de enfermos, aunque la reducción en la incidencia de trombosis fue marcada.

Aspirina y heparina subcutánea: Vinazzer [102] recientemente demostró una reducción en la incidencia de complicaciones tromboembólicas en pacientes sometidos a cirugía. El método de diagnóstico de trombosis no fue adecuado, ya que únicamente utilizó Ultrasonidos por efecto Doppler y no se realizaron estudios venográficos. El criterio para el diagnóstico de embolia pulmonar menor y fatal no fue especificado. El beneficio (si fue real) estuvo acompañado de una mayor incidencia de complicaciones hemorrágicas.

Ultra-bajas dosis de heparina endovenosa: Negus recientemente reportó el efecto de una dosis ultra-baja de heparina por vía endovenosa [68]. La dosis fue de 1 unidad por kilo de peso/hora, administrada durante cinco días. El diseño fue doble ciego y hubo una diferencia significativa

en la frecuencia de trombosis detectada por *scanning* con fibrinógeno marcado, con una reducción de 22 % a 4 %. A su vez, este régimen no estuvo asociado a complicaciones hemorrágicas. El número de enfermos incluidos fue limitado, pero no obstante este método representa una promisoria profilaxis, que necesita una evaluación más extensa.

Conclusiones y recomendaciones

Cirugía general: Dos formas de profilaxis han demostrado resultados efectivos, la heparina subcutánea y las botas de compresión neumática intermitente. La primera disminuye la incidencia de embolia pulmonar fatal. Esta es una diferencia con el método físico, ya que hasta el presente no ha habido estudios que demuestren un efecto protector contra complicaciones embólicas fatales. Ambos métodos son recomendados aunque el dispositivo mecánico es algo más económico [90] y no está asociado a riesgo hemorrágico.

Cirugía prostática: La heparina subcutánea ha demostrado ser inefectiva en este tipo de cirugía. Dos estudios mostraron resultados positivos con métodos mecánicos de compresión intermitente. Hasta el presente éste es el único método recomendable para la profilaxis de complicaciones tromboembólicas.

Neurocirugía: Ambos métodos, la heparina subcutánea y dispositivos mecánicos por compresión intermitente, han sido efectivos. Aunque en un estudio la administración de heparina no estuvo asociada a un riesgo mayor de hemorragia, este tipo de cirugía es una contraindicación relativa para el uso de heparina. Por lo tanto, la utilización de botas de compresión neumática son recomendadas para la prevención de complicaciones tromboembólicas.

Cirugía de cadera: Tres formas de prevención han demostrado ser efectivas en pacientes sometidos a cirugía electiva de cadera. Estas son: los anticoagulantes orales, la aspirina y el Dextrán. Los anticoagulantes orales han demostrado concluyentemente su efectividad. Dextrán es útil pero debe ser administrado por vía endovenosa, es costoso y su uso está asociado a un riesgo de hemorragia similar al de los anticoagulantes orales.

La aspirina mostró ser efectiva en algunos estudios. El efecto protector no fue demostrado en mujeres.

Las botas inflables podrían ser un método efectivo en este tipo de cirugía, aunque son necesarios mejores estudios en este aspecto.

Cirugía de rodilla: Dos métodos han demostrado resultados positivos. Altas dosis de aspirina y el dispositivo mecánico por compresión intermitente. Este último no está asociado a complicaciones hemorrágicas.

Cirugía de cadera en fractura de cuello de fémur: Los anticoagulantes orales han demostrado ser efectivos aunque asociados a un riesgo algo elevado de hemorragia.

Bibliografía

1. Aberg M, Bergentz SE, Hedner U: The effect of dextran on the lysability of ex vivo thrombi. *Ann Surg* 181: 342, 1975.
2. Abernethy EE, Hartsuck JM: Postoperative pulmonary embolism. A prospective study utilizing low-dose heparin. *Am J Surg* 128: 739, 1974.
3. Ahlberg A, Hylander G, Robertson B, Cronberg S, Nilsson IM: Dextran in prophylasis of thrombosis in fractures of the hip. *Acta Chir Scand Suppl* 387: 83, 1968.
4. Allenby F, Boardman F, Pflug JJ, Calnan JS: Effects of external pneumatic intermittent compression on fibrinolysis in man. *Lancet* 2: 1412, 1973.
5. Atik M: Dextran 40 and Dextran 70: A review. *Arch Surg* 94: 664, 1967.
6. Ballard RM, Bradley-Watson PJ, Johnstone CD, Kenney A, McCarthy TG, Campbell S, Weston J: Low doses of subcutaneous heparin in the prevention of deep vein thrombosis after gynaecological surgery. *J Obstet Gynaecol* 80: 469, 1973.
7. Becker J, Schampi B: The incidence of postoperative venous thrombosis in the legs. A comparative study on the prophylactic effect of Dextran 70 and electrical calf-muscle stimulation. *Acta Chir Scand* 139: 357, 1973.
8. Bonnar J, Walsh J: Prevention of thrombosis after pelvic surgery by British Dextran 70. *Lancet* 1: 614, 1972.
9. Bonnar J, Walsh JJ, Haddon M: Thromboembolism following radical surgery for carcinoma-prevention by Dextran 70 infusion during and immediately after operation. Proc IVth Cong Int Soc Thromb Haemost, Vienna, 1973, p 278 A.

10. Borgstrom S, Greitz T, Vander Linden W, Molin J, Rudics I: Anticoagulant prophylaxis of venous thrombosis in patients with fractured neck of the femur. A controlled clinical trial using venous phlebography. *Acta Chir Scand* 129: 500, 1965.
11. Bronge A, Dahlgren S, Lindquist B: Prophylaxis against thrombosis in femoral neck fractures. A comparison between Dextran 70 and Dicoumarol. *Acta Chir Scand* 137: 29, 1971.
12. Browse NL: Effect of surgery on resting calf blood flow. *Br Med J* 1: 1714, 1962.
13. Browse NL, Negus D: Prevention of postoperative leg vein thrombosis by electrical stimulation. An evaluation with ^{125}I labelled fibrinogen. *Br Med J* 3: 615, 1970.
14. Browse NL, Clemenson G, Crofton DN: Fibrinogen detectable thrombosis in the legs and pulmonary embolism. *Br Med J* 1: 603, 1974.
15. Browse NL, Jackson BT, Mayo ME, Negus D: The value of mechanical methods of preventing postoperative calf vein thrombosis. *Br J Surg* 61: 219, 1974.
16. Carter AE. Eban R, Pererret ED: Prevention of postoperative deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Br Med J* 1: 312, 1971.
17. Carter AE, Eban R: The prevention of postoperative deep vein thrombosis with Dextran 70. *Br J Surg* 60: 681, 1973.
18. Carter AE, Eban R: Prevention of postoperative deep venous thrombosis in legs by orally administered Hydroxychloroquine sulphate. *Br Med J* 3: 94, 1974.
19. Chrisman OD, Snook GA, Wilson TC, Rensselaer J: Prevention of venous thromboembolism by administration of Hydroxychloroquine. A preliminary report. *J Bone Joint Surg* 58 A: 918, 1976.
20. Clagett GP, Brier DF, Rosoff CB, Schneider PB, Salzman EW: Effect of aspirin on postoperative platelet kinetics and venous thrombosis. *Surg Forum* 25: 473, 1974.
21. Clark WB, MacGregor AB, Prescott RJ, Ruckley CV: Pneumatic-compression of the calf and postoperative deep-vein thrombosis. *Lancet* 2: 5, 1974.
22. Coe NP, Collins RE, Klein LA, Bettman MA, Skillman JJ, Shapiro RM, Salzman EW: Prevention of deep vein thrombosis in urological patients: A controlled, randomized trial of low-dose heparin and external pneumatic compression boots. *Surgery* 83: 230, 1978.
23. Coon WW, Coller FA: Clinicopathologic correlation in thromboembolism. *Sur Gynaecol Obstet* 109: 259, 1959.
24. Covey TH, Sherman L, Bauer E: Low dose heparin in postoperative patients. *Arch Surg* 110: 1021, 1975.
25. Dalen JE, Alpert JS: Natural history of pulmonary embolism. *In:* Sasahara AA, Sonnenblick EH, Lesh M (eds), Pulmonary embolism, Grune & Stratton, New York, 1975, p 77.
26. Data JL, Nies AS: Dextram 40. *Ann Intern Med* 81: 500, 1974.
27. Davidson AI, Brunt MEA, Matheson NA: A further trial comparing Dextran 70 with warfarin in the prophylaxis of postoperative venous thrombosis. *Br J Surg* 59: 314, 1972.
28. Dechavanne M, Soudin F, Viala JJ, Kher A, Bertrix L, De Morgues G: Prévention des thromboses véneuses. Succès de l'hépariné a fortes doses lors des coxarthreses. *Nouv Presse Med* 3: 1317, 1974.
29. Dejode LR, Khurshid M, Walther WW: The influence of electrical stimulation of the leg during surgical operations on the subsequent development of deep-vein thrombosis. *Br J Surg* 60: 31, 1973.
30. De Takats G: Anticoagulants in surgery. *JAMA* 142: 527, 1950.
31. Doran FSA, Drury M, Sivyer A: A simple way to combat the venous stasis which occurs in the lower limbs during surgical operations. *Br J Surg* 51: 486, 1964.
32. Evarts CM, Feil EJ: Prevention of thromboembolic disease after elective surgery of the hip. *J Bone Joint Surg* 53: 1271, 1971.
33. Eskeland G, Solheim K, Skjorten F: Anticoagulant prophylaxis, thromboembolism and mortality in elderly patients with fractures of the hip. A controlled clinical trial. *Acta Chir Scand* 131: 16, 1966.
34. Gallus AS, Hirsh J, Tuttle RJ, Trebilcock R, O'Brien SE, Carroll JJ, Minden JH, Hudecki SM: Small subcutaneous doses of heparin in prevention of venous thrombosis. *N Engl J Med* 288: 545, 1973.
35. Gallus AS, Hirsh J, Tuttle RJ, O'Brien SE, Gent M ,Hoicka G, McBride J: Prevention of venous thrombosis with small subcutaneous doses of theparin. *JAMA* 235, 1980, 1975.
36. Gordon-Smith IC, Le Quesne LP, Grundy DJ, Newcombe JF: Controlled trial of two regimens of subcutaneous heparin in prevention of postoperative deep-vein thrombosis. *Lancet* 1: 1133, 1972.
37. Groote Schuur Thromboembolus Study Group: Failure of low-dose heparin to prevent significant thromboembolic complications in high-risk surgical patients: interim report of a prospective trial. *Brit Med J* 1: 1447, 1979.
38. Gruber UF, Fridrich R, Duckert F: Prevention of postoperative thromboembolism by Dextran 40, low doses of heparin or xantinol nicotinate. *Lancet* 1: 207, 1977.
39. Hamilton HW, Crawford JS, Gardiner JH, Wiley AM: Venous thrombosis in patients with fracture of the upper end of the femur. *J Bone Joint Surg* 52: 268, 1970.
40. Hampson WGJ, Harris FC, Lucas HK, Roberts PH, McCall IW, Jackson PC, Powell NL, Staddon GE: Failure of low-dose heparin to prevent deep-vein thrombosis after hip replacement arthroplasty. *Lancet* 2: 795, 1974.
41. Handley AJ, Emerson PA, Fleming PR:

Heparin in the prevention of deep vein thrombosis after myocardial infarction. *Br Med J* 2: 436, 1972.
42. Harris WH, Salzman EW, Athanasoulis C, Waltman AC, Baum S, De Sanctis RW: Comparison of warfarin, low-molecular weight dextran, aspirin and subcutaneous heparin prevention of venous thromboembolism following total hip replacement. *J Bone Joint Surg* 56: 1552, 1974.
43. Harris WH, Salzman EW, Athanasoulis C, De Sanctis RW, Waltman AC: Aspirin prophylaxis of venous thromboembolism after total hip replacement. *N Engl J Med* 297: 1246, 1977.
44. Hills NH, Pflug JJ, Heyasingh K, Boardman L, Calnan JS: Prevention of deep-vein thrombosis by intermittent pneumatic compression of the calf. *Br Med J* 1: 131, 1972.
45. Hirsh J, Genton E: Low doses heparin prophylaxis for venous thromboembolism. *In:* Prophylactic therapy of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. DHEW, Publication Nº (NIH) 76: 866, 1975.
46. Hume M, Kuriakose TW, Javier ZL, Turner RH: ^{125}I fibrinogen and the prevention of venous thrombosis. *Arch Surg* 107: 803, 1973.
47. Hume M, Bierbaum B, Kuriakose TW, Surprenant J: Prevention of postoperative thrombosis by aspirin. *Am J Surg* 133: 420, 1977.
48. Hull R, Delmore TJ, Hirsh J, Cent M, Armstrong P, Lofthouse R, MacMillan A, Blacktone I, Redd-Davis R: Effectiveness of an intermittent pulsatile elastic stocking for the prevention of calf and thigh thrombosis in patients undergoing elective knee surgery. *Thromb Res* 16: 37, 1979.
49. International Multicentre Trial: Prevention of an intermittent pulsatile elastic stocking by low doses of heparin. *Lancet* 2: 45, 1975.
50. Johnsson SR, Bygdeman S, Eliasson R: Effect of Dextran on postoperative thrombosis. *Acta Chir Scand Suppl* 387: 80, 1968.
51. Kakkar VV, Spindler J, Flute PT, Corrigan T, Fossard DP, Crellin RQ: Efficacy of low-doses of heparin in prevention of deep vein thrombosis after major surgery: a double blind randomized trial. *Lancet* 2: 101, 1972.
52. Kakkar VV, Stramatkis JP, Bentley PG, Lawrence D: Prophylaxis for postoperative deep-vein thrombosis: synergistic effect of heparin and dihydroergotamine. *JAMA* 241: 39, 1979.
53. Kakkar VV: Preventing postoperative thromboembolism. *Br Med J* 2: 127, 1979.
54. Kiil J, Axelsen F, Kiil J, Andersen D: Prophylaxis against postoperative pulmonary embolism and deep-vein thrombosis by low-dose heparin. *Lancet* 1: 1115, 1978.
55. Kline A, Hughes LE, Campbell H: Dextran 70 in prophylaxis of thromboembolic disease after surgery: A clinically oriented randomized double-blind trial. *Br Med J* 2: 109, 1975.
56. Knight MTN, Dawson R: Effect of intermittent compression of the arms on deep venous thrombosis in the legs. *Lancet* 2: 101, 1972.
57. Kutnowski M, Vanderdris M, Steimberger R: Prevention of postoperative deep vein thrombosis by low dose heparin in urological surgery. A double blind randomized study. *Urol Res* 5: 123, 1977.
58. Lahnborg G, Friman L, Bergstrom K, Lagergen H: Effect of lowdose heparin on incidence of postoperative pulmonary embolism detected by photoscanning. *Lancet* 1: 329, 1974.
59. Lambie JM, Barber DV, Dhall DP, Matheson NA: Dextran 70 in prophylaxis of postoperative venous thrombosis. A controlled trial. *Br Med J* 2: 144, 1970.
60. Mannucci PM, Citterio LE, Panajotopoulos N: Low dose heparin and deep vein thrombosis after total hip surgery. *Thromb Haemost* 36: 157, 1976.
61. McKenna R, Galante J, Bachman F, Wallace DL, Kaushal SP, Meredith P: Prevention of venous thromboembolism after total knee replacement by high dose aspirin or intermittent calf and high compression. *Br Med J* 1: 514, 1980.
62. Medical Research Council (Report of the steering committee). Effect of aspirin on postoperative venous thrombosis. *Lancet* 2: 441, 1972.
63. Morris GK, Henry APJ, Preston BJ: Prevention of deep-vein thrombosis by low-dose heparin in patients undergoing total hip replacement. *Lancet* 2: 797, 1974.
64. Morris GK, Mitchell JRA: Prevention and diagnosis of venous thrombosis in patients with hip fractures. *Lancet* 2: 867, 1976.
65. Morris GK, Mitchell JRA: Warfarin sodium in the prevention of deep venous thrombosis and pulmonary embolism in patients with fractured neck of the femur. *Lancet* 2: 869, 1976.
66. Moskovitz PA, Ellenberg SS, Feffer HL, Kenmore PI, Neviaser RJ, Rubin BE, Varma CM: Low-dose heparin for prevention of venous thromboembolism in total hip arthroplasty and surgical repair of hip fractures. *J Bone Joint Surg* 60: 1065, 1978.
67. Myhre HO, Holen A: Tromboseprogylakse. Dextran eller warfarinnatrium? *Nord Med* 82: 1534, 1969.
68. Negus D, Cox SJ, Friedgord A, Peel ALG: Ultra-low dose intravenous heparin in the prevention of postoperative deep-vein thrombosis. *Lancet* 1: 891, 1980.
69. Nicolaides AN, Dupont PA, Desais S, Douglas JN, Fourides G, Lewis JD, Dodsworth H, Luck KJ, Jamieson CW: Small doses of subcutaneous sodium heparin in preventing deep venous thrombosis after major surgery. *Lancet* 2: 890, 1972.
70. Nicolaides AN, Kakkar VV, Field ES, Fish P: Optimal electrical stimulus for preven-

tion of deep-vein thrombosis. *Br Med J* 3: 756, 1972.
71. Nicolaides AN, Kakkar VV, Field SE, Fish P: Venous stasis and deep vein thrombosis. *Br J Surg* 59: 713, 1972.
72. O'Brien JR, Tulevski V, Etherington M: Two in-vivo studies comparing high and low doses of aspirin. *Lancet* 1: 399, 1971.
73. Pachter HL, Riles TS: Low dose heparin: bleeding and wound complications in the surgical patients. A prospective randomized study. *Ann Surg* 186: 669, 1977.
74. Pinto DJ: Controlled trial of an anticoagulant (warfarin sodium) in the prevention of venous thrombosis following hip surgery. *Br J Surg* 57: 349, 1970.
75. Ponder E, Ponder RV: Age and molecular weight of dextrans, their coating effects and their interaction with serum albumin. *Nature* 190: 272, 1961.
76. Prentice C, Lowe G, Forbes CD: Preventing postoperative thromboembolism. *Br Med J* 2: 128, 1979.
77. Rem J, Duckert F, Fridirch R, Gruber UF: Subkutane kleine hepaindosen zur tromboseprophylaxe in der allgemein chirurgie an urologie. *Schweiz Med Wochenschr* 105: 827, 1975.
78. Roberts VC, Cotton LT: Prevention of postoperative deep vein thrombosis in patients with malignant disease. *Br Med J* 1: 358, 1974.
79. Roberts VC, Sabri S, Beeley AH, Cotton LT: The effect of intermittently applied external pressure on the haemodynamics of the lower limb in man. *Br J Surg* 59: 223, 1972.
80. Roberts CV, Cotton LT: Failure of low-dose heparin to improve efficacy of preoperative intermittent calf compression in preventing postoperative deep vein thrombosis. *Br Med J* 3: 458, 1975.
81. Rogers Ph, Walsh PN, Marder VJ, Bosak GC, Lachman JW, Ritchie WM, Oppenheimer L, Sherry S: Controlled trial of low-dose heparin and sulfipyrazone to prevent venous thromboembolism after operation of the hip. *J Bone Joint Surg* 60: 758, 1978.
82. Rosenberg RD: Actions and interactions of antithrombin and heparin. *N Engl J Med* 292: 146, 1975.
83. Rosenberg IL, Evans L, Pollock AV: Prophylaxis of postoperative leg vein thrombosis by low-dose subcutaneous heparin or peroperative calf muscle stimulation: A controlled clinical trial. *Brit Med J* 1: 649, 1975.
84. Rosengarten DS, Laird J, Jeyasingh K, Martin P: The failure of compression stockings (Tubigrip) to prevent deep venous thrombosis after operation. *Br J Surg* 57: 296, 1970.
85. Rosengarten DS, Laird J: The effect of leg elevation on the incidence of deep-vein thrombosis after operation. *Br J Surg* 58: 182, 1971.
86. Sabri S, Roberts VC, Cotton LT: Prevention of early postoperative deep vein thrombosis by intermittent compression of the leg during surgery. *Br Med J* 4: 394, 1971.
87. Sabri S, Roberts VC, Cotton LT: The effects of intermittently applied external pressure on the haemodynamics of the hind-limb in grey hound dogs. *Br J Surg* 59: 219, 1972.
88. Sagar S: Heparin prophylaxis against fatal postoperative pulmonary embolism. *Br Med J* 2: 153, 1974.
89. Sagar S, Stamatakis JD, Higgins AF: Efficacy of low dose heparin in prevention of extensive deep-vein thrombosis in patients undergoing total hip replacement. *Lancet* 1: 1151, 1976.
90. Salzman EW, Davies GC: Prophylaxis of venous thromboembolism. Analysis of cost effectiveness. *Ann Surg* 191: 207, 1980.
91. Salzman EW, Ploetz P, Bettman M, Skillman J, Klein L: Intraoperative external pneumatic calf compression to afford long-term prophylaxis against deep vein thrombosis in urological patients. *Surgery* 87: 239, 1980.
92. Scottish study: A Multi-unit controlled trial: Heparin versus Dextran in the prevention of deep vein thrombosis. *Lancet* 2: 118, 1974.
93. Scurr JH, Ibrahim SZ, Faber RG: The efficacy of graduated compression stockings in the prevention of deep-vein thrombosis. *Br J Surg* 64: 371, 1977.
94. Sevitt S, Gallagher NG: Prevention of venous thrombosis and pulmonary embolism in injured patients. Trial of anticoagulant prophylaxis in middle-age and elderly patients with fractured neck of the femur. *Lancet* 2: 981, 1959.
95. Sevitt S, Innes D: Prothrombin-time and thrombotest in injured patients on prophylactic anticoagulant therapy. *Lancet* 1: 124, 1964.
96. Skilman JJ, Collins RE, Coe NP, Bettman M. Salzman EW: Prevention of deep vein thrombosis in neurosurgical patients: A controlled, randomized trial of external pneumatic compression boots. *Surgery* 83: 354, 1978.
97. Stamatakis JD, Kakkar VV, Lawrence D: Failure of aspirin to prevent postoperative deep vein thrombosis in patients undergoing total hip replacement. *Br Med J* 1: 1031, 1978.
98. Tsapogas MJ, Goussous H, Peabody RA, Karmody AM, Eckert C: Postoperative venous thrombosis and the effectiveness of prophylactic measures. *Arch Surg* 103: 561, 1971.
99. Turpie AGG, Gallus A, Beattie WS, Gent M, Hirsh J: Prevention of venous thrombosis in patients with intracranial disease by intermittent pneumatic compression of the calf. *Neurology* 27: 435, 1977.
100. Van Vroonhoven TJMV, Van Zijl J: Low dose subcutaneous heparin versus oral anticoagulants in the prevention of postoperative deep vein thrombosis. A controlled clinical trial. *Lancet* 1: 375, 1974.

101. Venous Thrombosis Clinical Study Group: Small doses of subcutaneous sodium heparin in the prevention of deep vein thrombosis after elective hip operations. *Br J Surg* 62: 348, 1975.
102. Vinazzer H, Loew D, Simma W, Brucke R: Phophylaxis of postoperative thromboembolism by low dose Heparin and by acetylsalicylic acid given simultaneously. A double blind study. *Thromb Res* 17: 177, 1980.
103. Weiss H: The effect of clinical dextran on platelet aggregation, adhesion and ADP release in man: in vivo and in vitro studies. *J Lab Clin Med* 69: 37, 1967.
104. Wray R, Maurer B, Shillingford J: Prophylactic anticoagulant therapy in the prevention of calf-vein thrombosis after myocardial infarction. *N Engl J Med* 288: 815, 1973.
105. Wright IS, Marple CD, Beck DF: Report of the committee for the evaluation of anticoagulants in the treatment of coronary thrombosis with myocardial infarction. *Am Heart J* 36: 801, 1948.
106. Zekert F, Kohn P, Vormittage P: Eine randomisierte studie die postoperative thromboseprophylaxe mit Acetylsalicysaure. *Med Welt* 27: 1372, 1976.
107. Zielinsky A, Hirsh J: Diagnóstico de la trombosis venosa profunda por métodos invasores y no invasores. *Medicina (Bs Aires)* 40: 708, 1980.

— — — —

From the earliest times medicine has been a curious blend of superstition, empiricism and that kind of sagacious observation which is the stuff out of which ultimately science is made. Of these three strains, superstition, empiricism and observation, medicine was constituted in the daus of the priest physicians of Egypt and Babylon; of the same three strains it is still composed. The proportions have, however, varied significantly; an increasingly alert and determined effort running through the ages has endeavored to expel superstition, to narrow the range of empiricism and to enlarge, refine and systematize the scope of observation... The general trend of medicine has been away from magic and empiricism and in the direction of rationality.

Desde los primeros tiempos la medicina estuvo hecha de una curiosa mezcla de superstición, empirismo y ese tipo de observación sagaz que es en definitiva la substancia de que la ciencia está hecha. De estos tres atributos, superstición, empirismo y observación, se constituyó la medicina en los tiempos de los médicos sacerdotes de Egipto y Babilonia; de estos tres atributos está constituida todavía hoy. Sin embargo, las proporciones han variado significativamente; un esfuerzo alerta y determinado, creciente a lo largo de los siglos, ha tratado de expulsar la superstición, disminuir el empirismo y ampliar, refinar y sistematizar el campo de la observación... La tendencia general de la medicina ha sido alejarse de la magia y el empirismo en dirección a la racionalidad.

ABRAHAM FLEXNER (1866-1959)

MEDICINA

FUNDADA EN 1939

PUBLICACION BIMESTRAL

(Registro de Propiedad Intelectual Nº 1.051.984)

MEDICINA no tiene propósitos comerciales. El objeto de su creación ha sido propender al adelanto de la medicina argentina. Los beneficios que pudieran obtenerse serán aplicados exclusivamente a este fin

Publicada con el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

EDITORIALES

Electrocardiograma y embolia pulmonar. En busca del tiempo perdido

Han transcurrido ya más de cuarenta y cinco años, desde que se describiera por primera vez la utilidad del registro electrocardiográfico en el diagnóstico de tromboembolismo pulmonar agudo (Mc Ginn S, White P: *Jama* 104: 1473, 1935). Desde entonces, numerosos métodos complementarios, algunos de ejecución e interpretación simples, otros más complejos, onerosos o cruentos, han ido sumándose a la interpretación del cuadro clínico para contribuir a la confirmación, siempre difícil, de la existencia de esta enfermedad. Pero durante mucho tiempo no existió, y probablemente tampoco exista en el momento actual, un criterio uniforme sobre el valor real de un método tan sencillo y de fácil repetición. Quizás estas discrepancias se deban a que, para juzgar la efectividad del ECG, es imprescindible que el diagnóstico del TEPA, efectuado en un considerable número de casos, no ofrezca dudas; que puedan determinarse con seguridad las afecciones asociadas o subyacentes capaces de alterar por sí mismas los trazados, y que exista suficiente certeza de que estos últimos hayan sido obtenidos en el momento oportuno de la evolución del TEPA. Estas premisas pueden cumplirse si se dispone de adecuada documentación anatomopatológica que, además de establecer el diagnóstico y la magnitud del TEPA, precise en la forma más segura posible la edad de los émbolos y su relación temporal con la clínica y el ECG. En este sentido, la experiencia realizada desde 1959 en el Instituto de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de Buenos Aires parece especialmente adecuada, teniendo sobre todo en cuenta que en el 75 % de los casos referidos en ella el TEPA fue causa determinante, o muy importante, de muerte.

El ECG es un método inespecífico para encontrar el TEPA, característica que, por otro lado, comparte con los demás procedimientos de estudio, con excepción de la angiografía pulmonar. Por el contrario, tiene muy alta sensibilidad, apareciendo cambios que sugieren el diagnóstico en más del 85 % de los casos. Sin embargo, sólo deben valorarse parámetros que aparecen por primera vez o que sufren modificaciones durante el curso de la enfermedad. Es decir, que deben considerarse cambios y variaciones, no patentes, estables y fijas. Sin ECG previos o con controles insuficientes o alejados de los episodios clínicos probables de TEPA, el valor del método decaerá sensiblemente.

Los criterios electrocardiográficos que apoyan la existencia del TEPA son, en orden de frecuencia:

1) *Cambios posicionales*, observables en más del 60 % de los casos (desviación del eje eléctrico en el plano frontal más allá de 20°, en más del 50 %; aparición de patente S_1Q_3 en casi el 25 %; aparición de rotación horaria sobre

el eje longitudinal en casi el 25 %; aparición de patente S_1, S_2, S_3 en 5 %, y aparición de QS en V_1 en 5 %). La desviación del eje en el plano frontal es más común en los cardiópatas, mientras que los demás hechos son más frecuentes en ausencia de cardiopatía.

2) *Alteraciones del ritmo*, que aparecen en más del 50 % de los casos, y que son más habituales si hay enfermedad cardíaca previa. Predominan las arritmias auriculares (más del 35 %) sobre las ventriculares (más del 25 %) y sobre los ritmos de la unión A-V (más del 5 %). De las arritmias auriculares, la más común es la fibrilación auricular (más del 20 %), seguida por la taquicardia auricular (más del 10 %), la extrasistolia auricular (casi el 10 %) y el aleteo (menos del 5 %). Los ritmos de la unión sólo parecen ocurrir en cardiópatas digitalizados. La arritmia ventricular hallada es la extrasistolia ventricular de distintos tipos, observándose rara vez, y como evento terminal, la taquicardia ventricular (menos del 5 %).

3) *Trastornos primarios de repolarización*, detectables en 40 % de los casos, sin que exista un franco predominio de los mismos en los pacientes con cardiopatía. Son más frecuentes los cambios tipo "isquemia izquierda" (casi el 25 %) y no la negativización de T en precordiales derechas (más del 10 %); asimismo, es alta la incidencia de segmento ST "en escalera" en precordiales izquierdas (casi el 20 %).

4) *Trastornos de conducción auriculoventricular*, cuya frecuencia es de casi el 20 %, y que sólo se dan en cardiópatas digitalizados. El bloqueo A-V de primer grado ocurre en más del 15 %, y tanto el bloqueo A-V de segundo como el de tercer grado en menos del 5 %.

5) *Trastornos de conducción intraventricular*, sólo objetivables en algo más del 10 % de los casos. El bloqueo de rama derecha aparece en no más del 10 %, siendo con igual frecuencia completo e incompleto, y sin franco predominio en los cardiópatas. El bloqueo de rama izquierda es excepcional (menos del 5 %) y se asocia a enfermedad cardíaca previa.

6) *Onda P pulmonar*, de aparición infrecuente (5 %), a diferencia de lo que ocurre en el corazón pulmonar crónico.

Es interesante recordar que la presencia de por lo menos uno de los criterios mencionados se constata en más del 80 % de los enfermos; dos criterios se hallan en 60 %; tres en 40 %, y cuatro en 30 %. Y que las asociaciones más comunes son la desviación del eje a la derecha más allá de 20° en el plano frontal acompañada por patente S_1Q_3, o por aparición de rotación horaria sobre el eje longitudinal; o por aparición de segmento ST "en escalera"; o de isquemia en precordiales izquierdas; o de taquiarritmias supraventriculares, en especial fibrilación auricular. La mayor parte de los datos que se acaban de referir, así como la discusión sobre los mecanismos capaces de originarlos, han sido dados a conocer hace casi diez años atrás (Gandulla L, Mordeglia D, Gil M: *Medicina (Bs Aires)* 33: 266, 1973). Sin embargo, es probable que los resultados de esta experiencia, que consideramos ajustada en su metodología y útil en la realidad, hayan tenido sólo relativa repercusión. Si no siempre los procedimientos complementarios más avanzados logran afirmar la presencia del TEPA, y si el ECG puede aportar tantos elementos sugerentes de diagnóstico en tantos enfermos y con tan pocos inconvenientes, es importante evitar que se lo olvide y volver, como ocurre con frecuencia en medicina, *à la recherche du temps perdu*.

F. MORDEGLIA Y L. GANDULLA

Necesidad de enseñanza y carencias profesionales en el tratamiento de los diabéticos

El descubrimiento de la insulina en 1922 y su inmediata aplicación provocó un gran entusiasmo y pareció resolver el problema de la etiología de la diabetes y posibilitar un tratamiento racional de la enfermedad. A pesar de haber transcurrido casi 60 años de esa fecha la diabetes y sus complicaciones siguen siendo una de las principales causas de muerte por enfermedad. Por las características peculiares de la misma, el paciente diabético debe aplicarse insulina, medir sus glucosurias, adecuar su ingesta de hidratos de carbono en horarios establecidos y regular su actividad. Por lo tanto, necesita ser adiestrado y educado para cumplir funciones de técnico de laboratorio, enfermero, dietista y médico. Todo lo anterior implica una suma de conocimientos, y un control de su vida cotidiana necesario para lograr disminuir las complicaciones agudas y crónicas asociadas con la enfermedad.

La necesidad de la enseñanza en estos enfermos no es un concepto nuevo; siempre los médicos han enseñado a los diabéticos a administrarse la insulina en la dosis necesaria y le han proporcionado las dietas a seguir, pero raramente han controlado a largo plazo la efectividad de su esfuerzos.

No existiendo muchos estudios destinados a investigar este problema, es así que resulta crucial en los enfermos diabéticos evaluar cuál es el grado de conocimiento que los pacientes tienen para el manejo de su enfermedad y la utilidad de la acción del grupo médico que trata al mismo.

Un estudio realizado en 1965 por varios investigadores y el National Health Survey de EE.UU. reveló que sólo el 10 % de los pacientes diabéticos sometidos a dietas tenían conocimientos suficientes para cumplirlas correctamente.

En el Estado de Minesota (EE. UU.) D. D. Etzwiler (*Diabetes* 16: 111, 1967) evaluó a pacientes y a profesionales con los siguientes resultados: Interrogando a grupos de diabéticos juveniles encontró que los pacientes menores de 12 años no comprendían los principios más elementales de la enfermedad; los pacientes entre 12 y 17 años sabían en su mayor parte interpretar las glucosurias y relacionarlas con la necesidad de insulina pero ignoraban la diferencia entre los distintos tipos de insulina a utilizar; en los grupos de mayor edad sólo el 50 % sabía interpretar el significado de la presencia de acetona en la orina. En general, todo el cuidado de la enfermedad en estos pacientes, estaba a cargo de sus padres, interrogando a éstos por medio de un cuestionario preparado, apareció una falta de conocimientos similar a la de sus hijos y sólo el 40 % de las madres y el 26 % de los padres respondieron correctamente a las preguntas elementales.

El paso siguiente fue evaluar el grado de conocimientos en cuestiones básicas de diabetes en 298 estudiantes de enfermería provenientes de 6 escuelas distintas; el cuestionario se realizó entre la 2ª y 4ª semana posterior a su graduación. Los resultados fueron sorprendentes: el 8 % no sabía que la insulina provocaba hipoglucemia; el 18 % no sabía que la insulina corriente actuaba en un lapso de pocas horas; el 44 % no conocía el efecto de la insulina exógena en un paciente diabético que no ingiere la dieta prescripta. Posteriormente, se presentó el cuestionario a 96 dietistas y se encontró que el 6 % ignoraba que la insulina era hipoglucemiante y que entre el 28 y el 40 % no podía correlacionar necesidad de insulina y ejercicio.

No fue posible evaluar el grado de conocimiento de los médicos en la misma forma que en los casos anteriores, pero indirectamente el autor obtuvo datos. Dado que regularmente se efectúan glucemias en la población general para detectar diabetes, de 89 casos que presentaron glucemias mayores de 120 mg %,

2 h post ingesta, se informó a sus médicos y posteriormente se les preguntó qué conducta habían seguido frente a esos casos sospechosos. No hubo respuesta en 7 casos, en 9 de los 82 casos restantes los médicos no repitieron el estudio, en 2 casos que presentaron glucemia elevada (196 y 198 mg %) no se consideraron diabéticos pues los controles efectuados en orina fueron negativos, otros 3 casos se descartaron pues las glucemias de ayuno fueron normales, 4 casos que fueron consignados como diabetes latente, no recibieron ninguna indicación dietética, 3 casos fueron medicados con terapia oral pero no suplementados con dieta. J. D. Watkins (*Am J Public Health* 57: 452, 1967) confirmó estos datos encontrando que entre el 65 y el 90 % de los pacientes diabéticos no sabían seleccionar sus alimentos y que, en la práctica, menos del 10 % de los pacientes seguían un régimen mínimo adecuado. Asimismo, detectó que 3 de cada 5 diabéticos cometían errores en la dosis de insulina que se aplicaban.

El informe de 1975 del National Commission on Diabetes indicó que en EE. UU. existen actualmente 10 000 000 de individuos que padecen diabetes y que, por la enfermedad y sus complicaciones, mueren por año aproximadamente 300 000. Todos estos datos son muy elocuentes y muestran claramente la necesidad de instrumentación adecuada al paciente a nivel profesional y técnico para lograr resultados efectivos en el tratamiento del diabético.

E. P. Cottini

Eficacia de la vacunación con BCG

La vacuna BCG se aplica en casi todo el mundo: en 64 países, en forma obligatoria y en 118, por recomendación de sus autoridades de salud. Ha sido incluida en el Programa Ampliado de Inmunizaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cuyo propósito es proteger a la niñez contra seis importantes enfermedades causantes de mortalidad, entre ellas la tuberculosis. Por sus escasos efectos secundarios, la BCG es considerada una de las vacunas más inocuas. A pesar de ello, y de que se la aplica hace más de medio siglo, todavía es objeto de controversias.

En estudios experimentales ha quedado demostrado que el mecanismo de protección que confiere el BCG contra la infección tuberculosa consiste en una reducción de la diseminación hematógena de los bacilos virulentos desde el sitio de infección primaria. No hay pruebas de que la vacunación disminuya el riesgo de infección, pero sí de que disminuye el riesgo de que la enfermedad se desarrolle, especialmente en sus formas primarias y posprimarias tempranas, que dependen de la diseminación hematógena (WHO Study Group: BCG vaccination policies, 1980).

La vacunación con BCG es simplemente –como lo explicaba en nuestro medio el Dr. O. C. Croxatto– una primoinfección con bacilos que mantienen las propiedades inmunogénicas del bacilo tuberculoso, pero no su patogenicidad. Ofrece, pues, las ventajas de una primoinfección virulenta, sin los peligros que ella entraña.

Como es sabido, la inmunidad antituberculosa se produce porque los pequeños linfocitos timodependientes, después de entrar en contacto con el antígeno micobacteriano, desarrollan procesos metabólicos que conducen a la liberación de linfoquinas. Estas activan los macrófagos, los que adquieren la capacidad de actuar en forma inespecífica contra la invasión bacilar. Conjuntamente con la inmunidad antituberculosa, aparece la alergia tuberculínica, estando ambos fenómenos interrelacionados.

La protección que la vacuna BCG confiere al hombre ha sido evaluada en estudios controlados, desde la década del 30 hasta nuestros días. Esa protección, medida por la reducción de la morbilidad y la mortalidad, en el grupo vacunado con respecto al no vacunado, ha variado entre el 0 y el 82 %. También se han hecho numerosos estudios retrospectivos con el mismo objeto (ten Dam HG, Toman K, Hitze KL, Guld J: Present knowledge of immunization against tuberculosis. *Bull WHO* 54: 255, 1976).

La efectividad del BCG quedó demostrada invariablemente en las condiciones en que la enfermedad se desarrolla al poco tiempo de haberse producido la infección, como ocurre en la tuberculosis infantil (ten Dam HG, Hitze KL: Does BCG vaccination protects the newborn and young infants? *Bull WHO* 58: 37, 1980).

Por el contrario, en un estudio llevado a cabo recientemente en la India, en el que se usó como indicador la tuberculosis pulmonar bacilífera, no se encontró que el BCG confiriera protección. Es necesario aclarar, sin embargo, que en este estudio incidieron múltiples factores locales, cuya suma, en opinión de los expertos (WHO Scientific Group: Vaccination against tuberculosis, 1980), contribuyó a neutralizar la acción de la vacuna. En la región donde se hizo el estudio, si bien la prevalencia de infección tuberculosa es sumamente alta, curiosamente, la incidencia de la tuberculosis bacilífera en las personas recientemente infectadas es relativamente baja. Por el contrario, en adultos mayores esa incidencia es muy alta. Este fenómeno está relacionado con el predominio regional de la variante india de *M. tuberculosis*, de baja virulencia. Raramente la enfermedad causada por la infección con esta variante bacilar se desarrolla en un lapso breve, sino que aparece tardíamente por reactivación endógena. La infección por esa variante bacilar tendría cierto efecto protector contra posteriores reinfecciones, que competiría con el efecto de la vacunación BCG.

También se observó la rápida desaparición de la respuesta tuberculínica posvacunal en la población, lo que indica que la respuesta del huésped no es del todo normal. Además, existe en la región un alto porcentaje de sensibilización por micobacterias "atípicas", las que también ejercen algún efecto protector y, por tanto, competitivo con el BCG. Por otra parte, la prevalencia de la lepra es muy elevada.

El estudio efectuado en la India no aportó información sobre la tuberculosis infantil ni sobre las formas no bacilíferas de la enfermedad en general, puesto que la detección de casos se centró en la tuberculosis pulmonar del adulto. Sus resultados "indican que la protección conferida por el BCG, lo mismo que por otras vacunas, depende de las condiciones epidemiológicas e inmunológicas que afectan tanto al agente infectante como al huésped".

La OMS, por intermedio de un Comité de Expertos, ha recomendado que se continúe usando la vacuna BCG, particularmente en los países con tasas de morbilidad tuberculosa medianas o altas, en los programas de inmunización masiva de lactantes y niños. Nuestro país, con un riesgo medio de infección estimado para la población de 0-4 años, en 0.47 %, y con un número de casos de meningitis tuberculosa, para 1980, algo superior al esperado para este índice, está indudablemente incluido en esa recomendación. (Información: Instituto Nacional de Tuberculosis, X Reunión Consejo Confederal de Control de la Tuberculosis).

Por otra parte, se ha hecho evidente la necesidad de efectuar estudios regionales de evaluación de la eficacia de la vacunación BCG. Creemos que en nuestro país existen condiciones adecuadas para la realización de algunos de estos estudios, por ejemplo: la determinación de la conversión tuberculínica posvacunal; el análisis retrospectivo "caso-control" de la tuberculosis infantil,

que consiste, en síntesis, en determinar la existencia o no de vacunación en un grupo de casos, y contrastar esa información con un grupo de controles: personas de igual edad y condiciones, pero no enfermos de tuberculosis.

Por último, hay que tener muy presente que, para que la vacunación alcance su máxima efectividad, es fundamental el cumplimiento de ciertos requisitos básicos: *a)* buena calidad de la vacuna, controlada por un laboratorio oficial, independiente del laboratorio productor; *b)* buena conservación de la vacuna: rápida distribución en cadena de frío; *c)* correcta aplicación intradérmica, y *d)* amplia cobertura de vacunación.

ISABEL NARVAIZ DE KANTOR

Centro Panamericano de Zoonosis (OPS/OMS), Buenos Aires

"Young doctors kill their patients; old doctors allow them to die." Joseph Tabara, author of the "Book of delights", written in the thirteen century, added a sting in his saying "A doctor and the Angel of Death both kill, but the former charges a fee". Another quip, recorded by Parkes Weber, is in the story that when Napoleon, during a fit of despondency, remarked that he would forsake war and turn physician the sarcastic Talleyrand whispered to the bystanders: "Toujours assasin".

"Los médicos jóvenes matan a sus pacientes, los médicos viejos los dejan morir". Joseph Tabara, autor del *Libro de las delicias* escrito en el siglo XIII, añadió este aguijón: "El médico y el Angel de la Muerte, ambos matan pero el primero cobra honorarios". Otra sátira, recordada por Parkes Weber, cuenta que Napoleón, durante un ataque de depresión aseguró que abandonaría la guerra y se haría médico, a lo cual el sarcástico Talleyrand susurró a los presentes: "Siempre asesino".

J. CLIFFORD HOYLE

Medical Ethics. Lloyd-Luke LTD, London, 1957

Enfermedad de Chagas y presión arterial

En el comentario de una Reunión Anatomoclínica publicada en *Medicina (Bs Aires)* [1], el Dr. S. Finkielman alude de manera crítica a un trabajo de nuestro grupo [2] en donde comunicábamos el hallazgo de presión arterial más baja que lo normal en un grupo de chagásicos. El Dr. Finkielman fundamenta su crítica en un informe de Mendivil y col. [3] publicado como Carta al Comité de Redacción. En este último estudio los autores encontraron en conscriptos de un área endémica para Chagas, que el comportamiento de la presión arterial era independiente del resultado de la inmunoserología para esta última enfermedad. En este trabajo no se comunican las condiciones de obtención de la presión arterial; es posible que las circunstancias que rodean el examen médico de los conscriptos hayan influido sobre los valores tensionales. Algo así expresan sus autores al comentar las cifras de presión arterial en sujetos con serología positiva sugiriendo que las mismas sean "expresión de un grupo particularmente predispuesto a manifestar su ansiedad con la aparición de signos cardiovasculares". Nos llama también la atención que la presión arterial sistólica del grupo control en este estudio (130.9 ± 0.6 mm Hg) sea bastante más alta que la encontrada por Moisset de Espanes [4] en un trabajo similar realizado en conscriptos del área Córdoba (118 ± 0.2 mm Hg). De cualquier manera la comparación de Mendivil y col. entre controles chagásicos es válida sólo para la edad de 18 años y no invalidan nuestros resultados que incluyen décadas de edad posteriores (20 a 30, 30 a 40 y 40 a 50); tampoco afectan otros hallazgos de nuestro estudio como la falta de correlación entre peso corporal y presión arterial en sujetos chagásicos y su menor incidencia de hipertensión arterial [2]. Por otro lado, el descubrimiento de hipotensión en el Chagas no es originalidad nuestra, ya que fue descripto por Laranja y col. como un hecho clínico de la enfermedad [5].

Otro argumento usado por el Dr. Finkielman en contra de la validez de nuestros resultados es el uso como control de las estadísticas poblacionales. En nuestro caso, los valores de presión arterial de la población general fueron obtenidos de un estudio epidemiológico previo realizado por uno de nosotros [6] con la misma metodología que en el trabajo de los chagásicos. Es posible que las determinaciones de presión arterial obtenidas en un consultorio médico sean diferentes a las determinaciones casuales de un estudio epidemiológico, no obstante, es de esperar que las de consultorio sean más elevadas; a pesar de ello, las presiones obtenidas en consultorio en sujetos chagásicos fueron en nuestro estudio inferiores a las de la población general [2]. Aparte de estas posibles diferencias metodológicas podría postularse que la presión arterial de los chagásicos del noreste argentino es realmente diferente a la de los del área Córdoba: en este sentido, nosotros hemos podido demostrar [7] que la respuesta de la presión arterial de nuestros chagásicos ante estímulos posturales, era distinta a lo que se había publicado en un grupo de pacientes similares de Brasil [8].

En otra parte de su comentario el Dr. Finkielman generaliza cuando dice "el defecto máximo de todos los estudios de enfermedad chagásica es que no se controlan". El problema de los controles adecuados no es exclusivo de la investigación en el Chagas sino común a toda investigación y mayor por cierto en la investigación clínica. El mismo Dr. Finkielman más adelante en su comentario, utiliza controles inadecuados al comparar miembros de las Fuerzas Armadas de Norteamérica (una población con selección previa) con un estudio epidemiológico de chaqueños y formoseños menores de 40 años (aparentemente sin selección previa).

Todo el comentario del Dr. Finkielman trasunta un cierto descreimiento en la enfermedad de Chagas crónica. Nosotros hemos pasado también por un período de duda; nuestros resultados publicados nos obligan ahora a creer, sobre todo porque "quien duda de lo que ve, una miajica tan sólo que sea, acaba por creer lo que no ve ni vio jamás" [9]

T. Caeiro, D. Iosa, H. Palmero
Hospital Privado, Córdoba

1. Linfoma de Burkitt y Coma Metabólico. Reunión Anatomoclínica. *Medicina (Bs Aires)* 41: 82, 1981.
2. Palmero H, Caeiro T, Iosa D: Efecto de la enfermedad de Chagas sobre la presión arterial. *Rev Arg Cardiol* 45: 415, 1977.
3. Mendivil GT, Schenone E, Princich J, Finkielman S, Duarte E, Bustamante A, Gorodner JO: La presión arterial en jóvenes de dieciocho años en un área endémica para la enfermedad de Chagas. *Medicina (Bs Aires)* 38: 741, 1978.
4. Moisset de Espanes E: Frecuencia cardíaca y presión arterial en estudiantes y conscriptos en Córdoba. *Rev. Soc Arg Biol* 17: 564, 1941.
5. Laranja F, Dias E, Nóbrega G, Miranda A: Chagas disease. A clinical epidemiologic and pathologic study. *Circulation* 14: 1035, 1956.
6. Palmero H, Caeiro A: Epidemiología de la hipertensión en Córdoba, Argentina. *Medicina (Bs Aires)* 31: 393, 1971.
7. Palmero H, Caeiro T, Iosa D: Distinctive abnormal responses to tilting test in chronic Chagas' disease. *Klin. Wochenschr* 58: 1307, 1980.
8. Marín Neto JA: Postural reflexes in Chronic Chagas heart disease. *Cardiology* 60: 343, 1975.
9. Unamuno M: Vida de Don Quijote y Sancho. Colección Austral. Ed. Calpe, 1975, p 68.

° ° °

La carta de los doctores Caeiro, Iosa y Palmero bien podría haber quedado sin respuesta pues ellos reiteran lo que han visto y citan otras observaciones que apuntalan sus conclusiones, mientras que yo había referido lo observado por nosotros y pensaba que no tenía nada que aclarar. Y estaríamos en paz. Sin embargo, no he sabido retraerme a ciertos estímulos. Primero, una larga relación amistosa con algunos de los autores de la carta; segundo, el aguijón de otros que aprecian una buena discusión civilizada y, tercero, una bella cita de Miguel de Unamuno.

Los doctores Caeiro, Iosa y Palmero no cuestionan todas mis afirmaciones sobre la enfermedad de Chagas. Sólo lo hacen con algunas que creen inconvenientes. Así no reparan en un párrafo que dice: "Estos estudios (sobre la enfermedad de Chagas) se confirmaron en grupos de mayor edad y no parece haber diferencias entre pacientes con serología negativa y pacientes con serología positiva". Entiendo que una cita de este tipo no se presta a una evaluación precisa y apenas puedo agregar que en unos 700 sujetos aparentemente normales de 20 a 42 años, con una incidencia de serología chagásica de alrededor del 20 %, no se observó diferencia significativa de la presión arterial entre chagásicos y no chagásicos. Pueden darme el crédito o no. O mejor, esperar la publicación del trabajo.

Y hay aun más cosas que dije en ese ateneo que es posible que los autores de la carta sientan que no les atañe; algunas de esas cosas fueron publicadas por Mendivil y col. [3]. Nos referimos a la ausencia de diferencias en la aparición de anormalidades electrocardiográficas entre sujetos con serología chagásica positiva y sus controles —todos de 18 años— y, además, el adelanto de una observación similar en una población de 20 a 42 años. Que los chagásicos sean o no hipotensos es, en todo caso, interesante pero una cuestión marginal. Mucho más grave es que las estadísticas no permitan poner en evidencia la presencia de una cardiopatía en la enfermedad de Chagas.

En mi intervención en el ateneo anátomoclínico tomé la en mí inusitada precaución de decir: "La definición de una enfermedad no es sólo estadística". "Lo que sí se puede negar es que esta cardiopatía tenga relevancia epidemiológica". Lo que significa simplemente que la cardiopatía chagásica crónica es una afección muy rara. Decía Confucio para justificar el *chung yung*, la dorada vía media, dos siglos antes de Aristóteles: "Ir demasiado lejos es lo mismo que no ir bastante lejos" [1]. Creí haber sido cuidadoso. Quizás no lo fui suficientemente. Claro que cuando se discuten hipótesis o se interpretan hechos, los argumentos contribuyen a dilucidar las divergencias. Pero cuando las diferencias se dan en las observaciones, en los hechos mismos, no hay conciliación posible. Que el noreste tenga chagásicos diferentes de los del centro del país no parece una explicación satisfactoria. Se necesitan, obviamente, más y mejores observaciones y los mejores controles. Y no me refiero a los autores de la carta porque, aunque no los ideales, ofrecen algún control. Pero no comparto la tolerancia a la falta de controles adecuados en investigación clínica. Mucho menos en una afección donde se supone que entre la agresión y su expresión patológica no existe una relación *post hoc* sino que median décadas.

Los autores de la carta dicen que han tenido sus dudas y que sus resultados los obligan ahora a creer. ¿A creer en sus resultados o en todo lo que se afirma sin fundamento de la enfermedad de Chagas? ¿Es que acaso el hecho de que los chagásicos sean —hipotéticamente— hipotensos y tengan reflejos cardiovasculares ligeramente diferentes, los hace cardiópatas o futuros cardiópatas? ¿Es esa una suerte de revelación en el camino de Damasco? Quien tome las cosas así de manera que se satisfaga con "una miajica tan solo que sea" confirmatoria, no necesitará buenos controles —difíciles— pero irremediablemente indispensables.

Solamente quiero agregar que la comparación de la alta incidencia de alteraciones electrocardiográficas en los 1100 sujetos de Formosa y Chaco con la muy baja de los 122 043 individuos enrolados en la aeronáutica norteamericana [2] —diferencia de un orden de magnitud— no es de tipo estadístico. No se trata de un control. Es sólo una expresión de sorpresa. La norma no suele expresarse con tal variabilidad.

Así que de cierta manera, respecto a la cardiopatía crónica de los sujetos con serología chagásica positiva, nuestros chagólogos— afirmada la celada, la cimera enhiesta, la visera volcada sobre los ojos dejándolos casi ciegos, lanza en ristre espoleando al pobre Rocinante— parecen embestir molinos de viento.

En fin, la paciente del ateneo no tenía cardiopatía chagásica. Y era hipertensa.

S. Finkielman
Instituto de Investigaciones Médicas,
Buenos Aires

1. Confucio: Lun Yu (Analectas) XI, 15, citado por C. Wing-Tsit, Historia de la filosofía china en Filosofía de Oriente. Ed. C. Wing-Tsit, Fondo de Cultura Económica, México, 1950, p 71.
2. Hiss RG, Lamb LE: Electrocardiographic findings in 122 043 individuals. *Circulation* 25: 947, 1962.
3. Mendivil GT, Schenone E, Princich J, Finkielman S, Bustamante A, Duarte E, Roldán L, Gorodner JD: Alteraciones electrocardiográficas en jóvenes con pruebas serológicas positivas para Chagas y residentes en área endémica. *Medicina (Bs Aires)* 39: 345, 1979.

Incidencia de las alteraciones hepáticas en relación con el fenotipo acetilador de la isoniacida

Hemos leído con gran interés el trabajo *Incidencia de las alteraciones hepáticas en relación con el fenotipo acetilador de la isoniacida*, de

J. A. Pilheu y col., publicado en *Medicina (Bs Aires)* 40: 382, 1980. En el mismo, los autores no encuentran relación entre algunas alteraciones biológicas (nivel sanguíneo de transaminasa glutámico-pirúvica, fosfatasa alcalina y bilirrubina) y el fenotipo acetilador de la isoniazida (INH) en una muestra de 133 pacientes tratados con esquemas que incluían INH.

Es de hacer notar que la alteración que suele asociarse con el fenotipo acetilador rápido es la hepatitis tóxica por INH y no pequeños aumentos de transaminasas u otras enzimas como los detectados por los autores (el valor más alto hallado fue de 90 UK para GPT). Mientras estos aumentos son bastante comunes, la hepatitis por INH es una complicación rara de los tratamientos con INH [1]. En realidad ambos cuadros (los aumentos de enzimas y la hepatitis) tienen no sólo frecuencia sino también evolución, pronóstico y distribución totalmente distintos. La hepatitis es excepcional por debajo de los 20 años, su máxima incidencia (del 2.3 % de los pacientes que reciben INH) se observa por encima de los 50 años, y tiene una letalidad del 12 % [3]; mientras que los pequeños aumentos de transaminasas (hasta 100 UK) se dan en el 10 al 12 % de los pacientes que reciben INH [1-4], no habiéndose hallado relación con la edad ni con otros factores como el fenotipo acetilador.

La probabilidad de detectar algún caso de hepatitis por INH en una muestra de 133 pacientes es muy baja. Justamente por la baja frecuencia de la hepatitis por INH se requiere emplear muestras seleccionadas de pacientes, por ejemplo aquellos que han padecido hepatitis por INH, para tratar de hallar una asociación con el fenotipo acetilador. Esta es, por ejemplo, la metodología empleada por Mitchell y col. [2], quienes así encuentran una asociación estadísticamente significativa entre hepatitis y fenotipo acetilador rápido, a partir de una muestra de 26 pacientes con hepatitis por INH (seleccionados de los 224 pacientes que presentaron esa complicación entre 13 838 pacientes que recibieron INH), confirmada por valores de transaminasa GOT de 200 a 4000 UK y biopsia hepática en casos límite.

Lamentablemente, los autores no analizan en su muestra la presencia de una serie de factores de riesgo habitualmente relacionados con las lesiones severas por INH, como la edad (ya mencionada), duración del tratamiento con INH [3], otras drogas que pudieran estar asociadas, etc., ni caracterizan mejor el criterio de "mestizo", a menos que exista algún trabajo (lo desconocemos) demostrando homogeneidad en los distintos componentes étnicos americanos. Creemos que con la información aportada por los autores se confirma la falta de asociación entre fenotipo acetilador y pequeños aumentos de enzimas hepáticas en pacientes que reciben INH, pero de ninguna manera se invalidan las evidencias que establecen la asociación entre fenotipo acetilador rápido y hepatitis por INH como parecen sugerir en la discusión.

R. A. Diez, J. Tessler
Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

1. Jeffies GH: Enfermedades del hígado, en *Tratado de Medicina Interna de Cecil y Loeb*, dirigido por PB Beeson y W McDermott. Nueva Editorial Interamericana, México, tomo II, pp 1576-1611, 1977.
2. Mitchell JR, Thorgeirsson UP, Black M, Timbrell JA, Snodgrass WR, Nelson SD: Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetilators: possible relation to hydrazine metabolites. *Clin Pharm Ther* 18: 70, 1975.
3. Mitchell JR, Zimmerman HJ, Ishak KG, Thorgeirsson UP, Timbrell JA, Snodgrass WR, Nelson SD: Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis. *Ann Intern Med* 84: 181, 1976.
4. Zimmerman HJ: Liver disease caused by medicinal agents. *Med Clin N Amer* 59: 897, 1975.

* * *

Los comentarios de los Dres. R. Diez y J. Tessler son importantes y estamos en un todo de acuerdo con las consideraciones que hacen con referencia a la hepatitis, los aumentos de transaminasas, fosfatasas y bilirrubina en los pacientes que reciben INH sola o en esquemas terapéuticos que contengan INH. El concepto de hepatitis ha sido encarado de manera diferente por los autores que han hecho estudios con las drogas antituberculosas y a veces se ha hablado de ella sin aportar la prueba histológica, que es indispensable. En algunos estudios que hemos hecho [1-3] tratando de relacionar la histología hepática y las modificaciones de los tests funcionales con el suministro de varias drogas antituberculosas, INH, RAMP y PZ, hemos observado precisamente la escasa repercusión histológica y funcional de esas drogas sobre el hígado, tanto cuando se las daba en forma aislada 15 días, como cuando se las daba en forma de esquemas terapéuticos asociados durante 2 ó 3 meses, a enfermos tuberculosos, con o sin alcoholismo asociado. El trabajo publicado sobre fenotipo acetilador de la INH y alteraciones de los tests funcionales hepáticos fue para estudiar solamente estos 2 factores, nunca para investigar la aparición de una verdadera hepatitis.

En cuanto a la relación entre fenotipo acetilador rápido de la INH y la aparición de hepatitis, dice muy bien Mitchell [4] que "ello no pasa de ser una hipótesis sobre el mecanismo de producción de hepatitis por la INH. La confirmación necesita más estudios metabólicos en pacientes. Además, es posible que algunos casos de hepatitis no sean producidos por hepatotoxicidad directa". Otros autores [5, 6], estudiando muchos miles de pacientes, no han hallado relación entre ambos factores.

Si bien las alteraciones funcionales estudiadas por nosotros son con frecuencia sin repercusión ulterior, merecen ser tenidas en cuenta porque algunos grupos de pacientes tuberculosos (alcoholistas, diabéticos, edad avanzada) pueden presentar alteraciones más importantes a nivel del hígado durante la quimioterapia; en estos grupos es aconsejable el control periódico.

J. A. Pilheu
Hospital Tornú, Buenos Aires

1. Pilheu JA, De Salvo MC, Barcat JA: Acción de los esquemas con Isocianida y Rifampicina sobre el hígado de enfermos tuberculosos. *Medicina (Bs Aires)* 39: 298, 1979.
2. Pilheu JA, De Salvo MC, Koch O: Esquemas terapéuticos antituberculosos con Pirazinamida. Su acción sobre el hígado. *Arq Brasil Tuberc Doenc Tor* 39: 69, 1980.
3. Pilheu JA, De Salvo MC, Koch O, Barcat JA: Estudio del hígado con microscopía de luz y electrónica en pacientes tuberculosos que reciben Rifampicina e Isoniacida. *Medicina (Bs Aires)* (en prensa).
4. Mitchell JR, Jollows DJ: Metabolic activation of drugs to toxic substances. *Gastroenterology* 68: 392, 1975.
5. Riska N: Hepatitis cases in Isoniazid treated groups and in a control group. *Bull Un Int Tuberc* 51: 1, 203, 1976.
6. Ellard G, Gammon P: The pharmacokinetics of Isoniazid metabolism in man. Advances in Antimicrobial and Antineoplastic Chemotherapy. Ed. M. Hejslar, München, 1972, p 45.

El reglamento de publicaciones, los autores y las secretarias

El editorial del Dr. A. P. Barousse *El reglamento de publicaciones, los autores y las secretarias,* publicado en *Medicina (Bs Aires)* 41: 1, 107, 1981, es excelente y merecería ser leído por todos aquellos que publican artículos en las revistas argentinas así como por quienes pretenden dirigir revistas y carecen de los conocimientos mínimos para hacerlo. Este desconocimiento de escritores y directores es una de las causas del bajo nivel de nuestras publicaciones.

Considero que el artículo mencionado pudo haber sido aún más completo. En el párrafo 15, dedicado a la Bibliografía, no se insistió suficientemente sobre la política seguida en los últimos años por un grupo de revistas de lengua inglesa que organizaron una reunión presidida por un *International Steering Committee* y elaboraron una publicación titulada *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.* Figuran en esa publicación las normas generales a que deben ajustarse las comunicaciones en un intento de uniformar criterios y mejorar la calidad científica de las revistas. Varias revistas que no figuraron en la reunión inicial han adherido posteriormente a ese Comité. Si *Medicina (Bs Aires)* no lo ha hecho hasta el presente, creo que debiera hacerlo, pues eso contribuirá a mantener el elevado nivel que ha mostrado hasta ahora.

J. A. Pilheu
Hospital Tornú, Buenos Aires

DER TOD

Wie wundervoll sind diese Wesen,
Die, was nicht deutbar, dennoch deuten,
Was nie geschrieben wurde, lesen,
Verworrenes beherrschend binden.
Und Wege noch im Ewig-Dunkeln finden.

LA MUERTE

Qué maravillosas son estas criaturas
que lo inexplicable aclaran.
Aquello jamás escrito leen.
La confusión, dominándola, ordenan
y en la oscuridad perpetua hallan su camino.

HUGO VON HOFFMANTHAL

COMENTARIOS BIBLIOGRAFICOS

Chemical diagnosis of disease. Stanley S. Brown, Frederick L. Mitchell, Donald S. Young (eds). Elsevier, North-Holland, Amsterdam, 1979, 1383 pp.

A pesar de la existencia de gran cantidad de obras donde se describen en forma detallada las metodologías que se emplean en el laboratorio clínico, sólo unas pocas profundizan en la interpretación y evaluación de los resultados obtenidos. A la más cuidadosa secuencia técnica debe seguir necesariamente la no menos cuidadosa interpretación bioquímica del dato o conjunto de datos obtenidos en el laboratorio, los que tomando al paciente como unidad, deben contribuir al correcto diagnóstico clínico diferencial. De allí surge la utilidad de un texto que aporte fundamentos teóricos que permitan un "diagnóstico químico de la enfermedad". Este es el intento de los editores de la presente obra. Para ello se ha consultado a destacados médicos y especialistas bioquímicos, quienes aportan su visión particular del problema.

Mas que detallar una secuencia metodológica determinada, se hace hincapié en el fundamento bioquímico de la reacción, aportando los conocimientos teóricos actualizados que llevan a una interpretación racional del capítulo en estudio. Si bien los distintos coautores ponen énfasis especial en el tema de su predilección, se ha cuidado en cubrir los temas de mayor interés clínico.

En el texto no se detallan pesos, medidas o secuencias de un procedimiento de laboratorio, indicándoselos sólo cuando se hace necesario para una correcta interpretación clínica del resultado. En la expresión de los mismos se utiliza el actual Sistema Internacional de Unidades (SI), pero aclarando siempre entre paréntesis la forma tradicional de expresión aún corrientemente en uso. Como bien lo señalan los autores, la bioquímica clínica puede ser dividida en tres grandes capítulos: analítico, investigativo e interpretativo de los resultados. A esta última parte se dirige fundamentalmente esta obra, pensando en médicos y bioquímicos. Y a decir verdad, es digna de ser leída.

Organization of afferents from brain stem nuclei to the cerebellar cortex in the cat. Barbara Brown Gould. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, Vol. 62, Springer-Verlag, Berlín, 1980, 92 pp.

Esta monografía constituye la tesis doctoral de la autora, la que estudia minuciosamente el origen de las proyecciones aferentes de la corteza cerebelosa desde los núcleos del tronco cerebral. Luego de una breve introducción, describe la metodología experimental utilizada, fundamentalmente la inyección de peroxidasa *(horseradish peroxidase)* en distintos sectores de la corteza cerebelosa del gato y la localización de los núcleos de origen de sus aferencias a través del transporte axonal retrógrado de dicho marcador. Luego de la exposición detallada y clara de sus hallazgos, presenta una revisión crítica y completa de la literatura más reciente sobre el tema. El formato general del libro, su organización interna y la calidad de la impresión del material gráfico presentado son inobjetables. El material bibliográfico incluye los aportes más importantes de la escuela escandinava, encabezada por Brodal, en relación a la compleja organización de las conexiones del cerebelo. Este libro está dedicado a neuroanatomistas y a estudiosos de la anatomía y función cerebelosas y puede ser muy valioso en ese sentido. Sin embargo, dado que carece de un intento de correlación funcional, los datos se presentan de un modo fundamentalmente enumerativo, lo que puede hacer poco placentera su lectura para el lector general no directamente interesado en este aspecto particular de la neurobiología. En cambio, es una recomendable revisión de los aspectos funcionales de las conexiones cerebelosas la presentada por Allen y Tsukahara en *Physiol Rev*, octubre 1974.

Beta Hemolytic Streptococcal Diseases. Burtis B. Breese, Caroline Breese Hall. Houghton Mifflin Pub., Boston, 1978, 287 pp.

Este libro refleja el interés, experiencia y preocupación del Dr. Burtis B. Breese durante más de 30 años por el estreptococo B-hemolítico, responsable de una de las infecciones bacterianas más frecuentes e importantes en el hombre. La fuente principal de este trabajo está constituida por el análisis de más de 15 000 fichas correspondientes a pacientes con infección estreptocóccica vistos por él o sus colaboradores en forma ambulatoria. A través de sus quince capítulos uno encuentra material útil y práctico sobre los aspectos de laboratorio, clínico y epidemiológico de este tipo de

infecciones. En la sección de bacteriología y serología, por ejemplo, es importante la información sobre toma de muestras e interpretación de los resultados; en la de epidemiología es interesante la opinión del autor sobre el significado de los portadores, la disminución de los casos secundarios cuando los pacientes son tratados precozmente (16 % vs 34.6 % en niños medicados después de las 48 h) y la indicación de la amigdalectomía en las infecciones estreptocóccicas recurrentes de difícil seguimiento. En los capítulos de clínica y tratamiento es donde con más claridad se traduce la experiencia personal del Dr. Breese. Su contenido, ilustrado con muy buenas tablas y fotografías, sirve de guía o norma para el diagnóstico y manejo racional de estas infecciones.

Es acertada la inclusión de un capítulo sobre el estreptococo B-hemolítico grupo B en el recién nacido, ya que este microorganismo ha reemplazado a la *E. coli* como el agente infectante más frecuente e importante durante el período neonatal. La parte final del libro está dedicada a la "prevención". Una vez más los autores explican con claridad los esquemas a aplicar para prevenir las infecciones estreptocóccicas, como así también la imposibilidad de pretender erradicarla de la población civil. Respecto a la vacuna, problemas insolubles en la actualidad, tales como poca antigenicidad, aparición de nuevas variantes de la proteína M e hipersensibilidad del huésped frente a nuevas infecciones, alejan la posibilidad de contar con una vacuna eficaz por el momento. Cada capítulo tiene referencias bibliográficas que se destacan por contener, además de las recientes, citas clásicas correspondientes a la era moderna del estreptococo. En resumen, se puede considerar que este es un libro bien estructurado y dirigido al médico pediatra y/o general interesado en los aspectos prácticos que atañen al diagnóstico, tratamiento y prevención de las infecciones estreptocóccicas.

Adrenal androgens. A. R. Genazzani, J. H. H. Thijssen, P. K. Siiteri (eds), Raven Press, New York, 1980, 382 pp.

La corteza suprarrenal produce glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos y andrógenos (que podrían llamarse cómodamente androcorticoides). Los dos primeros gozan de una amplia bibliografía repetidamente reunida y resumida. Ahora, con la aparición de este denso y valioso volumen, también la tienen los andrógenos corticales (AC). Denso en lo material y en lo conceptual, ofrece una visión panorámica, detallada y al día, del significado fisiológico y patológico de estas hormonas. El libro contiene 41 comunicaciones presentadas por 132 investigadores reunidos en el Symposio sobre Andrógenos Suprarrenales, celebrado en Siena en 1979, que abarcan temas de investigación básica y, principalmente, clínica. Entre los primeros figuran estudios sobre la zona reticular, el control de la secreción y el posible papel, en este sentido, de la prolactina, la concentración en las diversas zonas, el sistema enzimático que rige la síntesis y el control de la esteroidogénesis en la suprarenal fetal. En el orden clínico se presentan estudios sobre la acción de los AC en el desarrollo puberal y su significado en la adrenarquia y en la interrelación entre ésta y la gonadarquia, así como la regulación de la secreción en adultos. La vinculación de la prolactina y de la hiperprolactinemia con la producción de AC está expuesta en varias comunicaciones, y otras tantas se ocupan de la función de los AC en el hirsutismo, incluyendo la interpretación de la prueba de la dexametasona y de la administración de ciproterona. Otros trabajos tratan las diversas formas de disfunción hipotálamo-hipofisaria y la amenorrea secundaria y el papel que puede corresponder en ellas a los AC. Las variaciones de éstos en el embarazo y la postmenopausia son objeto de recomendables comunicaciones, así como su significado en la osteoporosis y la administración de dehidroepiandrosterona como su potencial tratamiento. Las variaciones de los AC en la insuficiencia suprarrenal secundaria y la deficiencia de hidroxiesteroide-dehidrogenasa en algunos casos de seudohermafroditismo masculino, son también presentadas con detalle. Las variaciones en la senectud son comunicadas en un trabajo que muestra la disminución progresiva de androstenediol y de dehidroepiandrosterona, tanto en hombres como en mujeres. Otras comunicaciones tratan el significado de los AC en el carcinoma de endometrio y el limitado valor del dosaje de esteroides urinarios en el pronóstico de la recurrencia postmastectomía del cáncer mamario. Las variaciones en el ayuno y en la anorexia nerviosa son enfocadas en varios trabajos. La enunciación de los temas que abarca este libro, indica cuántos son los investigadores a quienes va a interesar, aparte de que cada trabajo se cierra con una moderna bibliografía.

naprux

analgésico
antiinflamatorio
no esteroide

Como antiinflamatorio, en pruebas experimentales, 55 veces más potente que el Acido Acetil Salicílico y 12 veces superior a la Fenilbutazona.

Como analgésico: 7 veces más activo que el Acido acetil Salicílico.

Mayor tolerancia gastrointestinal: Resultados similares al placebo en la comparación.

No se le conocen manifestaciones nocivas a nivel renal, hepático, SNC, etc.

más efectividad con menos dosis

MAYOR POTENCIA MENOR TOXICIDAD

Fórmula: Cada comprimido contiene: Naproxeno ácido d-2-(6'-metoxi-2'-naftil) propiónico 250 mg; Excipiente, c.s.p. 1 comprimido.

Presentación: El envase original contiene 20 comprimidos.

Posología y forma de administración: La dosis aconsejada es de 1 comprimido por la mañana y 1 por la noche. En algunos casos, a criterio médico, la dosis puede ser aumentada a 1 comprimido por la mañana y 2 comprimidos por la noche o reducida a 1/2 comprimido por la mañana y 1 por la noche

Precauciones: Debido a su gran afinidad por las proteínas plasmáticas, Naprux puede desplazar a otros fármacos. En consecuencia, debe vigilarse su administración en pacientes bajo tratamiento simultáneo con anticoagulantes orales, hidantoínas, sulfonamidas y sulfas de acción prolongada, considerando el riesgo de sobredosificación relativa con estos productos. Como efectos colaterales pueden presentarse excepcionalmente cefalea, somnolencia, náuseas, anorexia, ardor epigástrico y otras alteraciones digestivas.

Andrómaco

SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

XXVI REUNION CIENTIFICA

DEL 7 AL 10 DE NOVIEMBRE DE 1981
HOTEL: HERMITAGE - MAR DEL PLATA

COMISION DIRECTIVA

Presidente:	Dr. VICTOR NAHMOD
Vicepresidente:	Dr. NESMO YEYATI
Secretario:	Dr. FRANCISCO STEFANO
Tesorera:	Dra. CELIA BERCOVICH
Vocales:	Dra. MARTA BARONTINI
	Dra. LAURA G. DE CONESA
	Dra. ELISA B. DE KIER JOFFE
	Dra. ALICIA B. MAZZOLLI
	Dra. MARIA T. MARQUEZ
	Dr. ALVARO GIMENO
Director de Publicaciones:	Dr. JUAN A. BARCAT

REPRESENTANTES DEL INTERIOR

Córdoba:	Dr. HUGO PALMERO
La Plata:	Dr. HORACIO CINGOLANI
Mar del Plata:	Dr. RICARDO PAZ
Mendoza:	Dr. RAUL ABAURRE
Rosario:	Dr. RODOLFO C. PUCHE

TEMAS DE CONFERENCIAS

Ingeniería Genética - Interferon - Cáncer - Fenómenos de Membrana - Neurotransmisión - Toxicología - Farmacalogía

INVITADOS NACIONALES Y EXTRANJEROS

LUIS FEDERICO LELOIR (Argentina)
EDUARDO DE ROBERTIS (Argentina)
ISIDRO VALLADARES (España)
ERNESTO FALCOFF (Francia)
DONALD DAVIES (Inglaterra)
RODOLFO PAOLETTI (Italia)
GERALD ZBINDEN (Suiza)
JORGE H. CROSSA (U.S.A.)
WALTER B. SEVERS (U.S.A.)

SIMULTANEAMENTE CON:

XVII REUNION SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION BIOQUIMICA
4 al 7 de Noviembre

XXVI REUNION SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA
7 al 10 de Noviembre

IX REUNION SOCIEDAD ARGENTINA DE INMUNOLOGIA
7 al 10 de Noviembre

XIII REUNION SOCIEDAD ARGENTINA DE FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL
9 al 11 de Noviembre

Secretaría: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MEDICAS
Donato Auvarez 3150 1427 Capital Federal Tel. 52-0061 al 64

Felden

Una diaria

NUEVO Y DIFERENTE ANTIINFLAMATORIO Y ANTIRREUMATICO

UNA VEZ AL DIA

MEDICINA (BUENOS AIRES)
FUNDADA EN 1939

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

REVISTA BIMESTRAL
(Registro de la Propiedad Intelectual Nº 87.075)

Publicada con el apoyo del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

MEDICINA no tiene propósitos comerciales. El objeto de su creación ha sido propender al adelanto de la medicina argentina. Los beneficios que pudieran obtenerse serán aplicados exclusivamente a este fin

Aparece en Current Contents, Biological Abstracts, Index Medicus y Excerpta Médica

REGLAMENTO DE PUBLICACIONES

MEDICINA *publica trabajos de medicina clínica o experimental, entendiéndose este término en el más amplio sentido de la palabra. Los artículos a publicarse deberán ser originales e inéditos aunque serán también aceptados aquellos que hubieran sido comunicados en sociedades científicas o publicados en forma de «resúmenes». En caso de haber sido presentado a la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, corresponderá mencionarlo citando la fecha de la reunión.*

La redacción se reserva, además, el derecho de introducir —con el conocimiento de los autores— todos los cambios editoriales exigidos por las necesidades tipográficas, la compaginación, el reglamento de publicaciones o por razones económicas.

Casuísticas, Adelantos en Medicina, Artículos Especiales y *Cartas al Comité de Redacción* serán publicados en castellano. Los *Artículos Originales* podrán redactarse en castellano o en inglés indistintamente. Los manuscritos deberán ser escritos a máquina, a doble espacio, y enviados por duplicado.

Las *historias clínicas* serán expuestas sintéticamente. Protocolos, registros, etc., sólo se reproducirán si ilustran significativamente el texto.

Las *tablas*, presentadas en hojas individuales, deberán estar numeradas, ser indispensables y comprensibles por sí mismas, y poseer un título claramente explicativo de su contenido. Sólo se permitirá una superficie total de tablas equivalente a una página de la Revista: todo excedente estará a cargo del autor.

Las *figuras* comprendiendo ilustraciones de cualquier naturaleza (radiografías, fotografías, registros, etc.), se presentarán numeradas correlativamente. En su parte posterior llevarán una inscripción a lápiz que permita identificarlas. Cada figura tendrá una leyenda explicativa. Debe evitarse la superposición de tablas y figuras.

La *bibliografía*, presentada en hoja aparte, deberá limitarse a aquellos artículos directamente relacionados con el trabajo mismo, evitándose las revisiones bibliográficas extensas que sólo serán aceptables en la sección *Adelantos en Medicina*. Las referencias se presentarán numeradas, en orden alfabético de autores *con los títulos de las publicaciones*. Los nombres de la revista figurarán en forma abreviada según el Index Medicus (ej.: J. Clin. Pathol. 19: 391, 1960). Los libros deberán figurar con su título, editor, ciudad y año de aparición.

Resumen: El trabajo deberá presentar un resumen de unas 200 palabras. *Además, contendrá un resumen más explicativo (de hasta 700 palabras) en inglés, con su título completo y con referencias a las figuras y tablas.*

Con motivo del constante aumento de los costos de edición, la Revista se hará cargo solamente de la impresión de 4 páginas (incluyendo tablas y figuras) para cada artículo original. Los autores deberán abonar los gastos que demande la mayor extensión de sus trabajos. El Comité de Redacción se reserva el derecho de solventar totalmente aquellos artículos de investigación clínica que considere de especial interés.

Se ruega enviar dirección postal y número de teléfono particular para facilitar el envío de pruebas de galera.

Secretaría y Redacción (de 8.30 a 17 hs.): Ana G. de Delisio, Instituto de Investigaciones Médicas, Donato Alvarez 3150, 1427 Buenos Aires. T. E. 52-0061/64.

Suscripción	Argentina	$	140.000
	Con cobrador a domicilio	$	155.000
	Números sueltos	$	30.000
	Extranjero	u$s	35

Correo Argentino — Central "B"
Franqueo pagado — Concesión Nº 856
Tarifa reducida — Concesión Nº 666

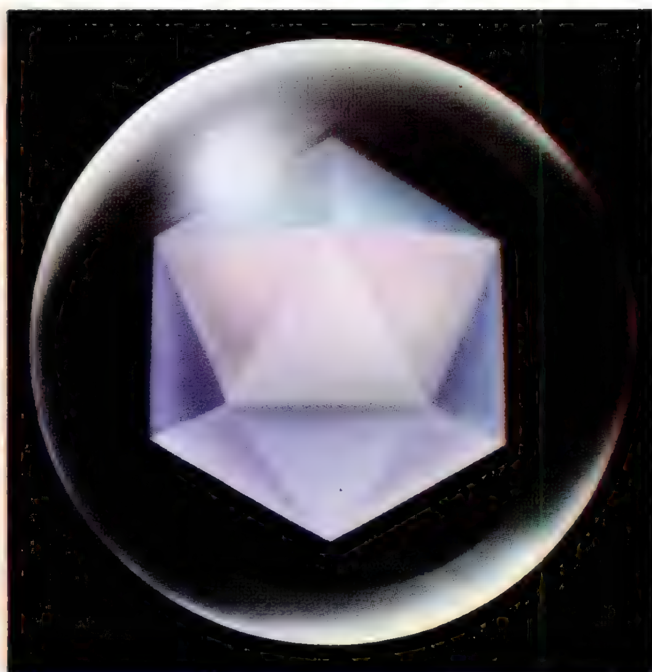
Publicidad: Dr. Horacio J. Delisio, T. E. 52-0061/64
Sra. Nélida B. de Pecoraro

Las suscripciones corresponden de enero a diciembre de cada año. Los pagos se podrán hacer personalmente o por correo con cheque o giros a la orden de Fundación Revista Medicina.

Impreso en ZLOTOPIORO S.A.C.I.F., Sarmiento 3149 - Bs. Aires, Argentina

INTER-A 11

Inmunoterapia antiviral, etiológica y sintomática (IGA 11S + Interferón)



- Inter A 11 provee al organismo los elementos fisiológicos para eliminar la infección viral productora de herpes simple, herpes simple recidivante, herpes zóster e infección varicelosa.
- Su contenido en IgA 11 asegura la eliminación del vírus en el medio extra-celular.
- El Interferón elimina el vírus del acantonamiento intra-celular pues a través de su mecanismo de acción impide su replicación intra-celular.

INTER A 11
Colirio

Fórmula:
Contenido 3 ml.
Cada frasco de liofilizado contiene:

IgA 11S	0,0045 g.
Interferón	90.000 Unidades

Indicaciones:
Queratitis herpética y sus recurrencias. Afecciones oculares de etiología virósica, bacteriana o mixta.

Posología:
Durante la fase aguda instilar 1 gota en cada ojo cada hora, no-menos de 12 veces en las 24 hs. Luego 1 gota en cada ojo 4 a 6 veces en el día hasta la remisión de la afección.

Contraindicaciones:
No tiene.

Efectos colaterales:
No posee.

Advertencias:
Una vez efectuada la solución mantener en la heladera (a 4° C).

Presentación:
Frasco con liofilizado y frasco gotero con 3 ml. de solvente.

INTER A 11
Ungüento

Cada 100 gr. de ungüento contienen:

IgA 11S	0,100 gr.
Interferón	3.000.000 Unidades

Indicaciones:
Herpes simple inicial, herpes simple recidivante.
Herpes zóster y lesiones varicelosas.

Posología:
Aplicar la pomada sobre la lesión herpética 4 a 6 veces al día.

Contraindicaciones:
No tiene.

Efectos colaterales:
No posee.

Precauciones:
No debe administrarse en lesiones oftálmicas.

Presentación:
Pomos de 5 gr.

ISSN 0025-7680

MEDICINA

BUENOS AIRES

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

ARTICULOS ORIGINALES

REUNION ANATOMOCLINICA

ADELANTOS EN MEDICINA

EDITORIALES

CARTAS AL COMITE DE REDACCION

— — — —

★ en inglés.

VOL. 41, Nº 5 1981

La decisión en Ajedrez: el Rey.
La decisión en Aminoglucósidos

Baymicina®

(Sisomicina Bayer)

Hasta 4 veces más eficaz que gentamicina

PRESENTACIONES:

Como Solución al 5%

Baymicina® 100: envase de 2 ampollas de 2 ml. con 100 mg. de sisomicina cada una.

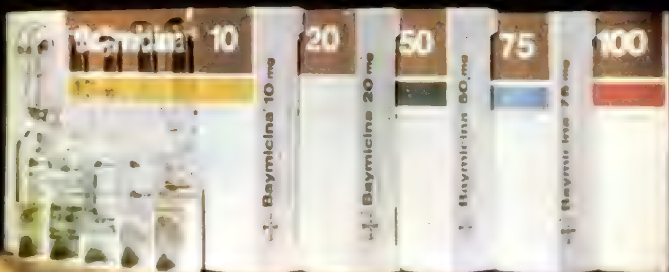
Baymicina® 75: envase de 2 ampollas de 1,5 ml. con 75 mg. de sisomicina cada una.

Baymicina® 50: envase de 2 ampollas de 1 ml. con 50 mg. de sisomicina cada una.

Como Solución al 1%

Baymicina® 20: envase de 2 ampollas de 2 ml. con 20 mg. de sisomicina cada una.

Baymicina® 10: envase de 2 ampollas de 1 ml. con 10 mg. de sisomicina cada una.



Bayer Argentina S.A.
División Farma
Empedrado 2435 - Buenos Aires/Argentina

Precio indicativo al público envase x 2 ampollas de 10 mg. $ 9.757.- (al 17.2.81)

MEDICINA

BUENOS AIRES

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

ORIGINAL ARTICLES

CLINICOPATHOLOGICAL CONFERENCE

ADVANCES IN MEDICINE

EDITORIALS

LETTERS TO THE EDITOR

BOOK REVIEWS

— — — —

★ in English.

VOL. 41, Nº 5 1981

línea de psicofármacos

Labinca

esfuerzo argentino
para una salud mejor

Precios al 22/6/81 con I.V.A. al público
NEUROZEPAM 3 mg. x 20 comp. $ 20.149
NEUROZEPAM 3 mg. x 50 comp. $ 41.305
NEUROZEPAM 6 mg. x 20 comp. $ 29.285
NEUROZEPAM 6 mg. x 50 comp. $ 60.036

NEUROZEPAM R

(bromazepam)

Control de las distimias

INDICACIONES: Inestabilidad o desequilibrio emocional. Irritabilidad. Agresividad. Agitación motriz. Tensión psíquica. Trastornos del sueño. Temores. Obsesiones. Neurosis de angustia, de ansiedad o emotiva, neurasténica, fóbica, histérica, obsesiva. Manifestaciones hipocondríacas. Labilidad psíquica senil.

POSOLOGIA: 1,5 a 3 mg; 2 ó 3 veces por día.

Precios al 22/6/81 con I.V.A. al público
JUSTUM 5 mg. x 20 comp. $ 16.402
JUSTUM 5 mg. x 50 comp. $ 37.752
JUSTUM 10 mg. x 20 comp. $ 23.997
JUSTUM 10 mg. x 50 comp. $ 53.814

JUSTUM R 5 y 10 mg

(clorazepato dipotásico)

Tranquilidad dinámica

INDICACIONES: Trastornos emocionales (angustia y ansiedad, irritabilidad, trastornos afectivos, hiperemotividad, fobias, neurosis obsesivas), trastornos psicosomáticos.

POSOLOGIA: 3 a 4 comprimidos por día.

Precios al 22/6/81 con I.V.A. al público
PRIMUM x 10 comp. $ 16.287
PRIMUM x 30 comp. $ 43.470

PRIMUM R

(flunitrazepam)

Serenidad en la noche - Plenitud al despertar

INDICACIONES: Todas las formas clínicas de insomnio, de cualquier etiología. Trastornos de la iniciación, trastornos de la continuidad, despertar precoz. Sueño liviano.

POSOLOGIA: Adultos: 1/2 a 1 comprimido al acostarse. En caso necesario puede ser aumentada a 2 comprimidos. Menores de 15 años: 1/4 a 1/2 comprimido.

Precios al 22/6/81 con I.V.A. al público
VEGESTABIL x 20 comp. $ 27.701
VEGESTABIL x 50 comp. $ 63.619

VEGESTABIL R

(sulpirida + clorazepato dipotásico)

Cobertura psicosomática integral

INDICACIONES: Estados de tensión psíquica, neurosis con manifestaciones psicosomáticas, organoneurosis, distonías neurovegetativas, distimia con manifestaciones somáticas a nivel de los distintos aparatos y sistemas y todo otro tipo de trastornos psicosomáticos: mareos, vértigos, cefaleas, espasmos musculares, etc.

POSOLOGIA: 2 a 4 comprimidos por día. En pacientes psiquiátricos estas dosis pueden llegar a duplicarse.

nuevo de Hoechst

PRETOR®

(Cefotaxima)

ARMONIA UNICA ENTRE AMPLITUD DE ESPECTRO, ACTIVIDAD Y TOLERANCIA

- El antibiótico de más amplio espectro.
- Estable frente a las β lactamasas bacterianas.
- Altas concentraciones en los sitios de infección.
- Eficacia y rapidez de acción.
- No altera la función renal.
- Antibiótico de elección, aún cuando los gérmenes no han sido identificados.
- Optima tolerancia en todas las edades.

PRETOR®

NO LE DA UNA SEGUNDA CHANCE A LA INFECCION

PRESENTACIONES

250 Mg	1	Fco. Amp.	con	1 Amp.	dil.	precio 3/81:	$ 18.909.-
500 Mg	"	"	"	"	"	" " " :	$36.358.-
1 g	"	"	"	"	"	" " " :	$69.919.-
2g	"	"	"	"	"	" " " :	$127.724.-

Asasantin®

El antiagregante plaquetario antitrombótico...

...con la formulación galénica exacta que asegura el éxito terapéutico (Estudio P.A.R.I.S.).

cajas x 20 $ 60.061
cajas x 50 $ 135.143

Penetración tisular:
Un factor decisivo en las infecciones del tracto urinario

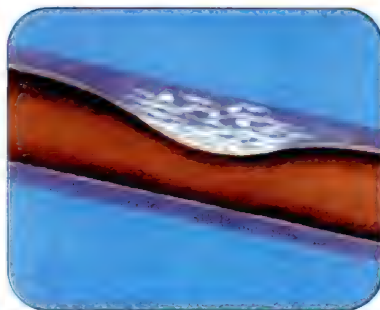
VELOCEF El factor decisivo

• PROBADA EFICACIA EN 5 AÑOS DE USO CLINICO, EN MAS DE 4 MILLONES DE PACIENTES EN TODO EL MUNDO: (1)

EN ANGINA DEBIDA A ESPASMO CORONARIO

- Total cesación de los ataques en el 63% de los pacientes. (4)
- Efectivo aún donde el propanolol y los nitratos fracasan.

COMO DROGA DE PRIMERA ELECCION EN ANGINA DE ESFUERZO (2)



- Reducción de más de 50% en el porcentaje de ataques. (3)
- Aumento en 80% de la tolerancia al esfuerzo. (3)

EN LA COMBINACION DE ANGOR POR ESPASMO Y OBSTRUCCION CORONARIA FIJA

- Efectivo en 73% de los pacientes. (5)

PRESENTACION: Envase de 50 cápsulas de 10 mg de nifedipina.

DOSIS INICIAL: 1 cápsula de 10 mg deglutida entera, 3 veces por día.

TITULACION DEL PACIENTE AMBULATORIO: El nivel de actividad física del paciente, la frecuencia de ataques y el consumo de nitroglicerina sublingual, pueden servir de guía al médico para incrementar la dosis de 10 mg tres veces por día a 20 mg tres veces al día para luego pasar a 30 mg tres veces por día.
Esta titulación puede ser realizada, en caso de necesidad, cada tres días. En la mayoría de los casos la titulación debe realizarse durante un período de 7 a 14 días, así el médico puede evaluar más adecuadamente la respuesta a cada nivel de dosis de la medicación.

1- Datos en archivo, Departamento Médico, División Laboratorios Pfizer, Pfizer Inc. New York. 2- Stone, P.H.; Antman, E.M.; Muller, J.E.; Braunwald, E.- Ann. Int. Med. 93:886-904, 1980. 3- Mueller HS, Ferst JA, Chahine R: Reporte interno de un estudio doble ciego multicéntrico, placebo-controlado de nifedipina en angina estable crónica. Presentado en el American Association Meeting, Miami, Noviembre 20, 1980.
4- Antman E, Muller J, Goldberg S, et al: Terapia de Nifedipina para espasmo arterial-coronario: experiencia en 127 pacientes. N Engl J Med 302: 1269-1273, Junio 5, 1980. 5- Nitani H, Fujimaki T: Experiencia clínica con nifedipina para las enfermedades isquémicas del corazón en Hashimoto K, Kimura E, Kobayashi T (eds): Ist International Nifedipina Symposium: New Therapy of Ischemic Heart Disease. Tokyo, University of Tokyo Press, 1975, pp268-278.

cla

claforan

nuevo antibiótico de máxima potencia

COMPOSICION: CLAFORAN es Cefotaxime sódico (250 mg; 500 mg; 1 g; 2 g) una nueva molécula antibiótica con el más amplio espectro bactericida frente a gérmenes gram positivos, gram negativos y anaerobios.

PROPIEDADES: CLAFORAN ha demostrado su actividad mediante pruebas in vitro frente a los gérmenes: estafilococos, estreptococos (el Streptococcus faecalis es poco sensible), Streptococcus pneumoniae, Escherichia Coli, Citrobacter, Klebsiellas, Enterobacter sp., Serratia, Proteus (indol positivos e indol negativos), Providencia sp., Haemophilus influenzae, Neisseria. Menos sensibles: Pseudomonas aeruginosa y Bacteroides fragilis.

INDICACIONES: CLAFORAN está indicado en aquellas infecciones simples o mixtas producidas por cepas sensibles de los gérmenes anteriormente citados, tales como infecciones de las vías respiratorias, infecciones urinarias, sepsis, endocarditis, meningitis, infecciones óseas, de las articulaciones, tejidos blandos y de la piel, infecciones de la cavidad abdominal (peritonitis, infecciones de las vías biliares y del tracto gastrointestinal), infecciones otorrinolaringológicas, quemaduras o heridas infectadas, infecciones de los órganos genitales, infecciones en ginecología y obstetricia.

POSOLOGIA Y MODO DE EMPLEO

- Vía intramuscular (CLAFORAN 1000 - CLAFORAN 500 y 250)

  Disolver el CLAFORAN en su ampolla de solvente e inyectar profundamente en la región glútea.

- Vía intravenosa (CLAFORAN 2000; CLAFORAN 1000 CLAFORAN 500 y 250)

  Disolver el CLAFORAN en su ampolla de solvente y después
  - ya sea inyectar la solución por vía endovenosa directa, lentamente en la vena o en la tubuladura de la perfusión.
  - o utilizar la solución en perfusión continua o discontinua de una duración de 20 a 60 minutos.

La posología, la vía de administración y el ritmo de las inyecciones se eligen en función de la naturaleza y de la severidad de la infección, del estado del enfermo, así como de la sensibilidad de los gérmenes al cefotaxime.

En el adulto:

- La posología usual es de 2 g por día, en 2 inyecciones de 1 g.
- En los casos más severos, esta dosis se aumentará a 3 ó 4 g por día en 2 a 4 inyecciones.
- En los casos sumamente severos, la dosis podrá alcanzar por vía venosa, 12 g por día.

En el niño y en el lactante:

- La dosis cotidiana habitual es de 50 a 150 mg kg, repartida en 2 a 4 inyecciones.
- Excepcionalmente, la posología diaria puede alcanzar 200 mg kg.
- La administración en el prematuro está en curso de estudio.

Hasta que se establezca la posología, se recomienda no sobrepasar la dosis de 50 mg/kg/día, en razón de la inmadurez renal.

En el insuficiente renal:

La posología se ajustará modificando, ya sea la dosis unitaria, ya sea el ritmo de las inyecciones, teniendo en cuenta los niveles séricos del antibiótico, la depuración de la creatinina o la creatinina sérica. En pacientes con clearance de creatinina menor de 20 ml /min. la dosis total diaria de Claforan debe disminuirse a la mitad.

PRECAUCIONES DE EMPLEO

- Interrumpir el tratamiento en caso de reacción alérgica.
- Adaptar la posología en caso de insuficiencia renal orgánica o funcional.
- La asociación de medicamentos potencialmente nefrotóxicos y de diuréticos poderosos deberá tener en cuenta los riesgos debidos a estos medicamentos.
- En mujeres embarazadas.

EFECTOS INDESEABLES

- Reacciones locales: se han señalado flebitis después de inyecciones endovenosas a dolor en el punto de inyección en las inyecciones intramusculares.
- Reacciones generales: se han observado casos de erupción cutánea, de fiebre, de eosinofilia, de diarrea, de leucopenia transitoria, de elevación pasajera de las transaminasas TGO y TGP y de las fosfatasas alcalinas.
- La asociación con aminoglucósidos como así también con polimixina B y colistina aumenta la nefrotoxicidad de los mismos.

INTERACCION CON LAS PRUEBAS BIOLOGICAS

Se puede obtener una reacción falsamente positiva cuando se investiga la glucosa en la orina con sustancias reductoras, pero ello no ocurre cuando se utilizan los métodos específicos con la glucosa-oxidasa.

Puede producir alteración de las pruebas de Coombs.

ADVERTENCIAS Y RECOMENDACIONES

- En los sujetos hipersensibles a la penicilina, la utilización del CLAFORAN debe ser prudente, siendo necesaria una vigilancia médica estricta desde la primera inyección.
- En la mujer embarazada, la seguridad de empleo no ha sido establecida, a pesar de que en la experimentación animal no se ha puesto en evidencia efecto teratogénico.
- No se debe mezclar el CLAFORAN con ningún otro antibiótico en la misma jeringa o la misma perfusión.
- Utilizar la preparación extemporánea. La estabilidad de una solución de cefotaxime en las soluciones de perfusión (isotónica de Cl Na, glucosa al 5%, solución de Ringer) es satisfactoria durante 24 horas en la heladera y 12 horas a temperatura no mayor de 23°C.
- Conservar los frascos de CLAFORAN al abrigo de la luz y el calor.

CONTRAINDICACIONES

Está contraindicado en los sujetos alérgicos a las cefalosporinas. Puede existir alergia cruzada con la penicilina.

EFECTOS TOXICOS, ANTAGONISMOS, ANTIDOTISMOS

No se conocen.

ROUSSEL

Avellaneda 2202 - (1636) OLIVOS (B.A.) - 791-8011/16 y 9041/4

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 511-519 (1981)

PLASMAFERESIS EN MIASTENIA GRAVE *

W. O. JAUREGUI, C. DI GRESSIA, M. E. HERRERA, S. MUCHNIK

Centro Nacional de Rehabilitación Respiratoria María Ferrer, Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y Hospital Español, Buenos Aires

Actualmente se acepta que la falla de la transmisión neuromuscular que caracteriza a la miastenia grave (MG) es debida a depoblación de receptores nicotínicos en la placa motora [5] y que la destrucción de éstos es debida a la acción de anticuerpos (IgG) con afinidad antirreceptor [4]. Por lo tanto, resultaría razonable en estos enfermos la indicación terapéutica de un método tal como la plasmaféresis capaz de disminuir la cantidad circulante del anticuerpo patógeno. La primera experiencia basada en esta idea fue la de Pinching y col.[13] en 1976, y desde entonces su utilización ha tenido rápida difusión. Aunque comunicaciones posteriores han señalado acertadamente ciertos inconvenientes del método tales como el costo, riesgos y transitoriedad de los resultados [7], opinamos que la combinación de plasmaféresis e inmunosupresión es una buena opción para aquellos miasténicos que continúan muy afectados pese a recibir anticolinesterásicos y glucocorticoides en dosis óptimas y a haber sido timectomizados. Debido a que las publicaciones previas sobre la eficacia del tratamiento [3, 6, 18] están basadas fundamentalmente en datos clínicos y no abundan en comparaciones estadísticas, decidimos realizar plasmaféresis a un grupo de pacientes y cuantificar su evolución mediante algunos parámetros representativos de la fuerza de varios grupos musculares que luego pudieran ser tratados estadísticamente para demostrar la utilidad del método. Por otro lado, el análisis de las datos obtenidos en este estudio preliminar nos permitió llegar a algunas conclusiones que luego expondremos.

Material y métodos

Se trataron 6 pacientes con MG tipo III o IV de la clasificación de Osserman [15], cuyas edades oscilaban entre 13 y 28 años y que pertenecían 5 al sexo femenino y uno al masculino. Todos dieron su consentimiento luego de que se les explicaran las características del tratamiento. Todos se hallaban severamente incapacitados pese a haber sido timectomizados y estar bajo tratamiento con dosis óptimas de piridostigmina, glucocorticoides, efedrina y suplementos de potasio. A 4 pacientes se les realizaron 6 sesiones de plasmaféresis y a los dos restantes 5 y 8 sesiones. El intervalo entre las plasmaféresis varió entre 1 y 9 días. Las plasmaféresis se hicieron mediante la técnica de exanguineotransfusión utilizando sangre compatible de un donante sano en la primera y los eritrocitos del propio paciente resuspendidos en 50 % de plasma humano liofilizado más 50 % de solución "fisiológica" en las siguientes sesiones. El acceso vascular se hizo a través de una gruesa canalización en la vena safena interna en 5 casos y con cánulas de Scribner en el restante. El volumen total de plasma extraído varió entre 1000 y 1750 ml por sesión. Se midieron seriadamente 4 parámetros de fuerza muscular: capacidad vital forzada (CVF), fuerza de prehensión con las manos mediante un manómetro *ad hoc* (FP), tiempo máximo de

---

Recibido: 17-VI-1981. Aceptado: 14-VII-1981.

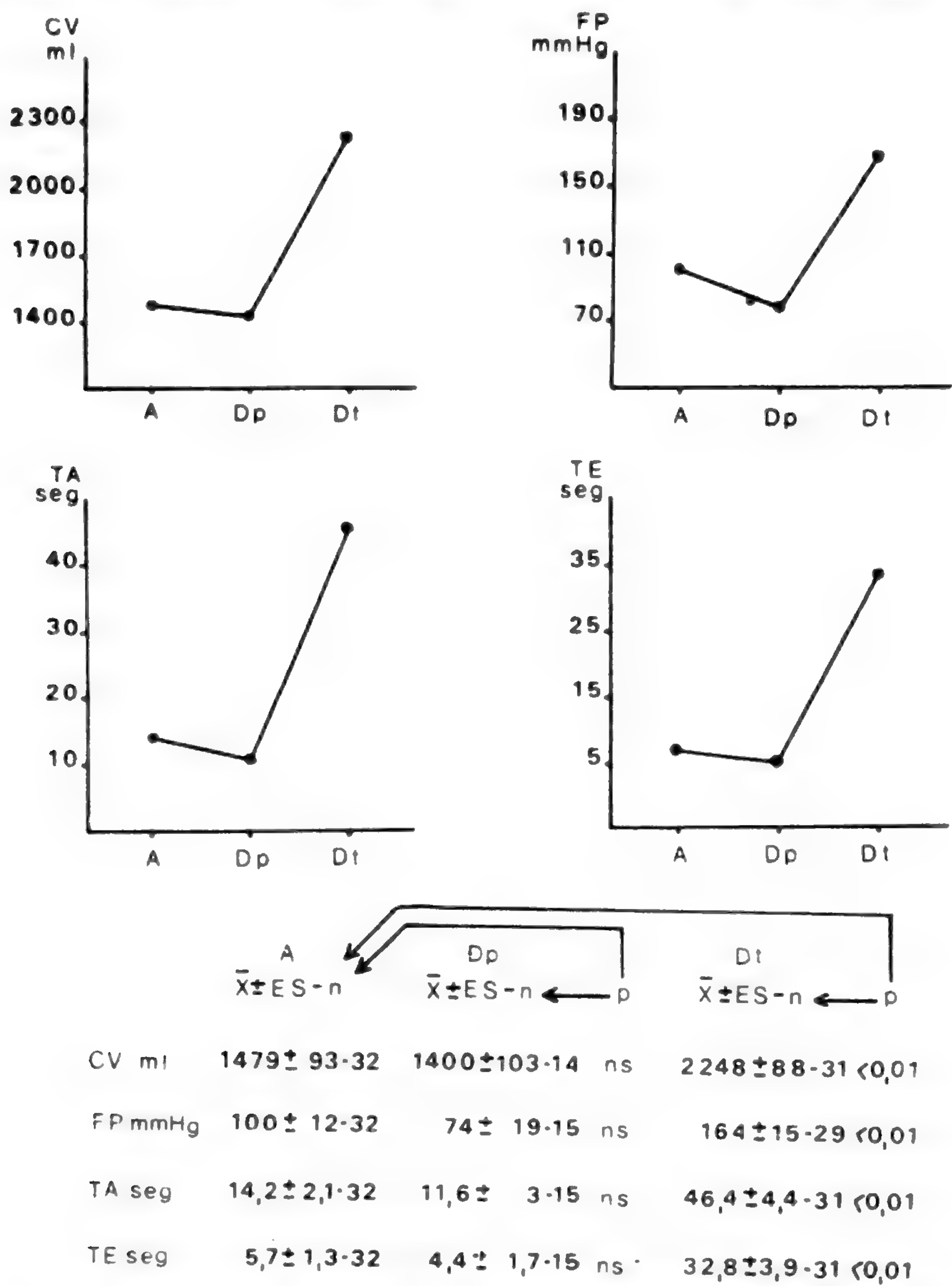
* Este trabajo fue presentado en las 2as. Jornadas Médicas del Hospital Español.

Dirección postal: Centro Nacional de Rehabilitación Respiratoria María Ferrer, Dr. E. Finochietto 349, 1272 Buenos Aires, Argentina.

abducción de los miembros superiores (TA) y tiempo máximo de elevación de los miembros inferiores 30° sobre el plano de la cama (TE). Las determinaciones se hicieron repetidamente durante períodos de 4 a 17 días antes del comienzo de las plasmaféresis y de 12 a 17 días después del inicio del tratamiento. Los pacientes fueron estudiados siempre a la misma hora y se obtuvieron medidas pareadas: una inmediatamente antes de la administración de una dosis de piridostigmina y otra 1 ½ h después de la misma, para apreciar el efecto de los anticolinesterásicos. Los pacientes se hallaban en una etapa estable de la enfermedad y durante el período en que se les realizó plasmaféresis no se modificó la medicación que recibían, excepto el agregado de 2 mg/kg peso/día se azatioprina a partir del día de la primera de ellas. Los estudios estadísticos se hicieron mediante análisis de varianza para dos y para varios grupos [12].

Resultados

Las determinaciones realizadas fueron divididas en 3 períodos: antes (A) de las



	A X̄±ES-n	Dp X̄±ES-n	p	Dt X̄±ES-n	p
CV ml	1479± 93-32	1400±103-14	ns	2248±88-31	<0,01
FP mmHg	100± 12-32	74± 19-15	ns	164±15-29	<0,01
TA seg	14,2±2,1-32	11,6± 3-15	ns	46,4±4,4-31	<0,01
TE seg	5,7±1,3-32	4,4± 1,7-15	ns	32,8±3,9-31	<0,01

Fig. 1. — Capacidad vital (CV), fuerza de prehensión con las manos (FP), tiempo máximo de abducción de los miembros superiores (TA) y tiempo máximo de elevación de los inferiores (TE) de los 6 pacientes agrupados en cada etapa antes (A) de las plasmaféresis, después precozmente (Dp) y después tardíamente (Dt). Se observa que los cuatro parámetros tienen un comportamiento similar, con un descenso no significativo estadísticamente en Dp y luego un ascenso significativo para una $p < 0.01$ en Dt. En las figuras se han representado las medias aritméticas (X) lo mismo que en la tabla al pie donde se agregaron los errores standard (ES) y el tamaño de la muestra (n).

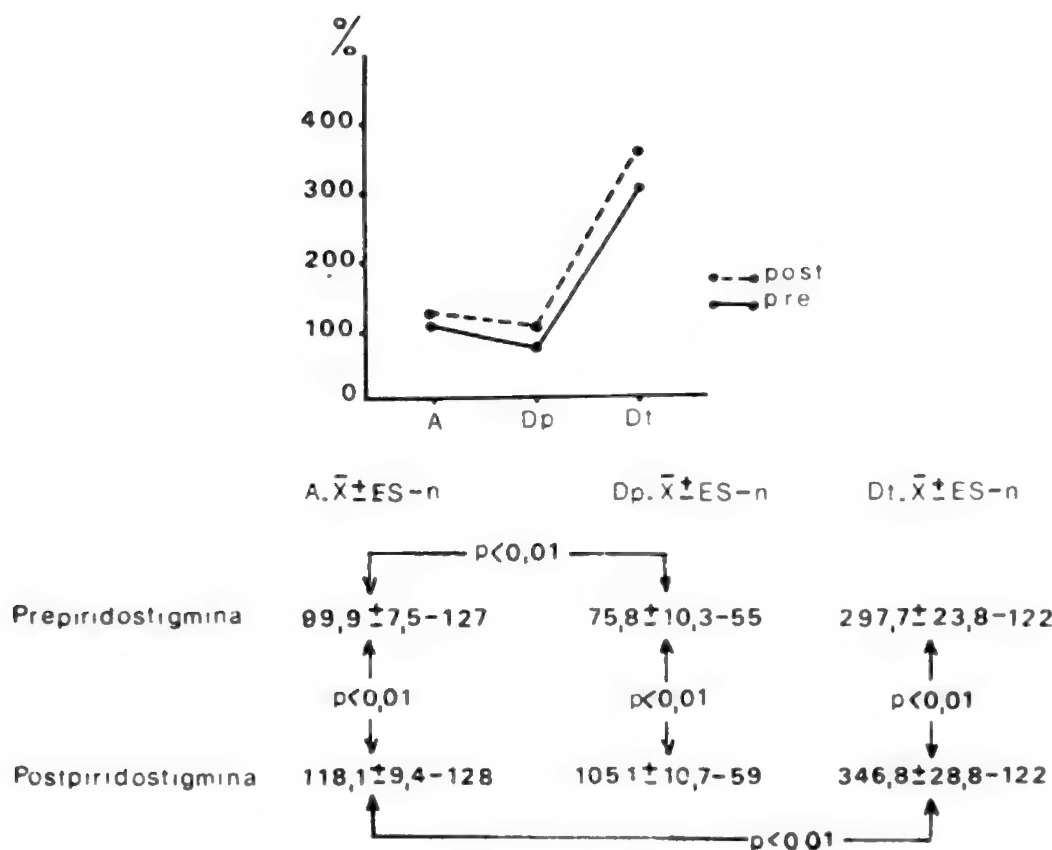


Fig. 2. — Con línea llena se han representado las mismas determinaciones que se usaron en la Figura 1, realizadas a los 6 pacientes, en las 3 etapas A, Dp y Dt antes de la administración de una dosis de piridostigmina, pero cuantificadas y agrupadas de otro modo. Las mediciones no se expresaron en su valor absoluto sino como porcentaje del valor promedio de los 6 pacientes durante el período A para el grupo muscular correspondiente; luego se reunieron todos estos porcentajes de **los 6 pacientes** y de **los 4 grupos musculares** en un solo promedio, en cada etapa A, Dp y Dt. Para trazar la línea punteada se procedió del mismo modo con las determinaciones realizadas 1 ½ h después de administrar a los enfermos una dosis de piridostigmina. Tal reordenamiento de los mismos datos que en la Figura 1 es válido estadísticamente y permite agrandar el tamaño de las muestras a comparar con las consecuentes ventajas estadísticas. Se observa que las diferencias pre y post piridostigmina para cada una de las etapas son significativas para una $p < 0.01$; también es significativa la mejoría de Dt con respecto a A luego de la piridostigmina (la misma mejoría prepiridostigmina ya fue demostrada en la Figura 1). Finalmente, el empeoramiento de Dp con respecto a A que no era significativo en la Figura 1, se revela aquí como significativo para una (p $<$ 0.01. En la Tabla se consignan las medias (X), errores standard (ES) y tamaños de las muestras (n) así como las p para las 5 comparaciones hechas.

plasmaféresis, después precozmente (Dp) (los 3 días siguientes a la primera plasmaféresis) y después tardíamente (Dt) (los restantes días). Las causas de la subdivisión de los resultados postplasmaféresis fueron que los primeros efectos beneficiosos del tratamiento se hicieron evidentes recién alrededor del 4º día y que, además, algunos pacientes empeoraron inicialmente; vale decir que el período Dp tiene peculiaridades que justifican, a nuestro entender, su separación.

En la Figura 1 se pueden observar las medidas de CVF, FP, TA y TE de los 6 pacientes agrupados, medidos antes de recibir una dosis de piridostigmina, en las tres etapas A, Dp y Dt. Como se ve, la media de los 4 grupos musculares experimentó una caída no significativa en Dp y luego una mejoría en Dt muy significativa.

La Figura 2 está confeccionada en base a los mismos datos que se usaron en la Figura 1, pero cuantificados y agrupados de otro modo. Las mediciones no se expresaron en sus valores absolutos sino como porcentajes de la media del período A del grupo muscular correspondiente; luego se reunieron los porcentajes así calculados de todos los pacientes y de todos los grupos musculares y se promediaron en cada etapa A, Dp y Dt. Esta forma de homogeneizar las determinaciones permite aumentar el tamaño de las muestras. En la Figura 2

también se han representado del mismo modo las mediciones hechas 1 ½ h después de administrar al paciente una dosis de piridostigmina, para poder apreciar el efecto de los anticolinesterásicos. El gráfico permite observar que la caída de la fuerza muscular en el período Dp descripta en la Figura 1 y que no resulta estadísticamente significativa para ninguno de los grupos musculares aislados, merced al nuevo tratamiento estadístico agrupado se revela significativa para una $p < 0.01$. Se ve nuevamente el aumento de la fuerza en Dt, que es de alrededor del 300 % con respecto a A. También son significativas las diferencias entre las determinaciones pre y postpiridostigmina en cada una de las 3 etapas.

La Figura 3 analiza específicamente la influencia de la plasmaféresis sobre la respuesta a los anticolinesterásicos. Dicha respuesta fue definida como la diferencia entre cada par de mediciones pre y postpiridostigmina; luego las diferencias halladas fueron standardizadas expresándolas como porcentaje de la media del período A del correspondiente grupo muscular. Finalmente, los porcentajes de todos los grupos musculares y de todos los pacientes en los períodos A y Dt fueron promediados y comparados. En la figura se observa que hubo significativa mejoría de la respuesta a los anticolinesterásicos luego de la plasmaféresis.

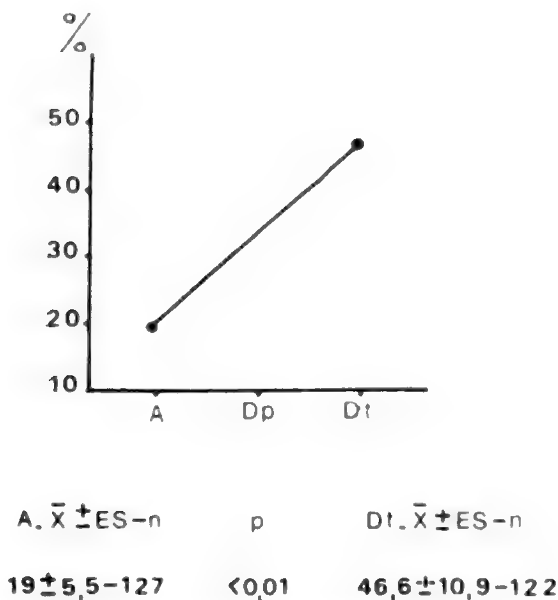


Fig. 3. — Respuesta a los anticolinesterásicos. La respuesta fue definida como la diferencia entre cada par de mediciones pre y postpiridostigmina; luego las diferencias halladas fueron expresadas como porcentaje del promedio de las mediciones prepiridostigmina de los 6 pacientes en el período A para el grupo muscular correspondiente. Finalmente, fueron agrupados y comparados los porcentajes así obtenidos en todos los pacientes y de todos los grupos musculares en los períodos A y Dt. Se observa una mejoría significativa en Dt.

En la Tabla 1 se encuentran los resultados de una serie de determinaciones de parámetros hemáticos que son afectados por la plasmaféresis y que fueron realizadas en distintos momentos durante los períodos Dp y Dt a cada paciente. Se comprueba que la media del hematocrito, leucocitos, plaquetas, sodio plasmático, potasio plasmático, cloro plasmático, tiempo de Quick, KPTT, albúmina plasmática y gammaglobulina plasmática se hallan dentro del rango de la normalidad, aunque hay valores individuales que escapan de dichos límites (analizar desvío standard).

TABLA 1. — *Determinaciones hemáticas hechas a los pacientes durante los períodos Dp y Dt. Se observa que las medias se hallan dentro del rango de la normalidad (en nuestro laboratorio el rango normal de KPTT es 55 a 65 seg), aunque el análisis del desvío standard (ds) demuestra que hay valores individuales fuera de dichos límites*

		X	ds	n
Hematocrito	%	40.7	3.7	14
Leucocitos	mm^{-3}	9405	3477	21
Na plasma	$mEq.l^{-1}$	141	3.8	7
K plasma	$mEq.l^{-1}$	4.1	0.34	12
Cl plasma	$mEq.l^{-1}$	98.2	9.1	6
KPTT	seg	63.8	9.2	11
Quick	%	75.4	11.6	11
Plaquetas	mm^{-1}	324 000	86 200	5
Albúmina plasma	$g.dl^{-1}$	3.32	0.55	3
Gamma plasma	$g.dl^{-1}$	1.48	0.63	3

Discusión

En 1934 Walker [20] demostró que los anticolinesterásicos eran eficaces agentes terapéuticos en la MG, y Lanari en 1937 [10] comprobó que la inyección de neostigmina en un miembro cuya circulación estaba

aislada mediante un torniquete colocado proximalmente con respecto al sitio de la punción corregía la parálisis muscular, deduciendo que los inhibidores de las colinesterasas ejercían su efecto actuando sobre la unión mioneural y que allí debía radicar la lesión que causaba la enfermedad. Luego Dahlbäck [2] estudió electrofisiológicamente las placas motoras y halló que el defecto básico era la disminución de la amplitud de los potenciales miniatura; tal defecto podía tener origen presináptico o postsináptico. En 1973 Fambrough y col. [5], trabajando con cortes histológicos de placas motoras incubados con alfabungarotixina marcada [*], halló disminución de la cantidad de receptores nicotínicos de la membrana postsináptica. Posteriormente, Engel y col. [4] encontraron con el microscopio electrónico depósitos de IgG y C 3 en la membrana postsináptica, sugiriendo que la causa de la depoblación podía ser un fenómeno autoinmune. Asimismo, se habían hallado en el suero de pacientes miasténicos anticuerpos dirigidos contra los receptores colinérgicos nicotínicos [11]. Estos conceptos acerca de la existencia de un factor plasmático patogénico son coherentes con la posibilidad que existe de transferir pasivamente la enfermedad a animales de experimentación mediante la inyección de suero de pacientes [10] y con la vieja observación de la miastenia neonatal que afecta temporariamente a algunos niños nacidos de madres miasténicas que transmitirían por vía placentaria los anticuerpos al feto [8]. Las hipótesis sucintamente delineadas hasta aquí parecen definitivamente establecidas y en el momento actual se está investigando sobre el evento inicial que desencadena la respuesta de autoinmunidad. En tal sentido, merece mencionarse el probable rol del timo en el cual se han hallado células llamadas mioides [21] (miotubos con receptores en su sarcolema) que podrían jugar un rol en la estimulación del sistema inmune, el que luego agredería mediante anticuerpos a las placas motoras sistémicamente. La enfermedad sería entonces similar al modelo experimental que se logra inyectando a ratas o conejos una suspensión de receptores colinérgicos heterólogos, lo que les provoca la aparición de anticuerpos circulantes y depoblación de receptores [17]. Quedaría así también explicado el efecto beneficioso que tiene la timectomía sobre los pacientes con MG [16].

Basándose en la existencia de una proteína plasmática patogénica, Pinching y col. [18] trataron con plasmaféresis a un grupo de miasténicos, con la esperanza de que el descenso de la concentración sérica de anticuerpos antirreceptor que mediante ella se logra condujera a la recuperación de la transmisión neuromuscular. Su ensayo fue exitoso y comunicaciones posteriores confirmaron los hallazgos [3, 6]. Nuestros resultados, consignados en las Figuras 1 y 2, demuestran con criterios estadísticos una mejoría de la fuerza en los 4 grupos musculares estudiados, respiratorios y de los miembros, de alrededor de 300 %, que es coincidente temporalmente con el tratamiento y que puede ser atribuida a él. Sin embargo, la administración de azatioprina a los pacientes concomitantemente con el comienzo de las plasmaféresis nos obliga a hacer ciertas salvedades en cuanto a la validez de tales conclusiones. Esta droga inmunosupresora se usa para evitar la proliferación del clono linfoplasmocitario patológico que se produce luego de la plasmaféresis debido a la disminución del título del anticuerpo antirreceptor, ya que habitualmente los anticuerpos circulantes tienen un *feed-back* negativo sobre las células que los sintetizan [1]. La expansión del clono patogénico elevaría nuevamente el título de anticuerpos y provocaría la recaída de la enfermedad. Este fenómeno pudimos observarlo en una paciente no incluida en este trabajo, a quien se le realizaron plasmaféresis sin inmunosupresión, pues presentaba una grave infección pulmonar, y que luego de mejorar recayó en sus síntomas después de alrededor de una semana. Como la azatioprina ha probado ser eficaz por sí sola en el tratamiento de la MG [13], actuando probablemente como inmunosupresor, cabe preguntarse si la mejoría observada en nuestro grupo de pacientes fue debida a ella y no

---

* La alfabungarotoxina es un veneno de cobra que tiene la propiedad de ligarse selectiva e irreversiblemente a los receptores colinérgicos nicotínicos.

a la plasmaféresis; este mismo interrogante ha sido formulado en publicaciones anteriores. Si bien no podemos responderlo en forma terminante, ya que aún no se ha investigado la eficacia de la plasmaféresis como único tratamiento en comparación con su asociación con inmunosupresores, es nuestra opinión que la rápida e importante mejoría que experimentaron nuestros pacientes se debió al intercambio de plasma, porque tal forma de respuesta terapéutica es diferente a la que se observa con azatioprina sola, que actúa débil y demoradamente [13].

En la Figura 2 se demuestra el empeoramiento que sufren los pacientes en los primeros días luego del comienzo de las plasmaféresis. En algunos casos el agravamiento fue muy acentuado, y un paciente llegó a experimentar severa incapacidad ventilatoria, que revirtió luego de administrársele 0.5 mg im de neostigmina. Una explicación factible para este fenómeno es la siguiente: se sabe que la unión de los anticuerpos patogénicos a los receptores nicotínicos produce dos fenómenos que llevan a su depoblación: 1) lisis de la membrana postsináptica mediada por complemento [4], y 2) aumento de la fase catabólica del *turn-over* normal de receptores por aumento de la internalización de las moléculas receptoras [9]. Hay evidencia suficiente también de que in vivo el efecto farmacológico bloqueante de tipo curare de los anticuerpos sobre los receptores es poco importante [4], probablemente porque el anticuerpo se une a determinantes antigénicos de la molécula del receptor, que son distintos al sitio de ligadura de la acetilcolina. Por lo tanto, es posible que la disminución del título plasmático de anticuerpos mediante la plasmaféresis no produzca un efecto beneficioso inmediato sobre la transmisión sináptica, ya que esto se producirá recién cuando se sintetisen nuevos receptores (de ahí, probablemente, la demora de 4 días observada en nuestros pacientes para la aparición de los primeros síntomas de mejoría, tiempo razonablemente semejante a la vida media del *turn-over* de los receptores sinápticos, que es de 3 días). Además, como la plasmaféresis produce depuración plasmática no sólo de anticuerpos sino también de piridostigmina, durante los días iniciales del tratamiento el paciente queda deplecionado del anticolinesterásico y sin beneficio aun en la población de receptores. En caso de ser ciertas algunas conjeturas, los pacientes habrían empeorado durante la etapa Dp debido a falta de anticolinesterásicos, pasando por una situación similar a las crisis paralíticas de tipo miasténico.

En la Figura 2 se puede observar que la fuerza de todos los grupos musculares se incrementaba luego de la administración de una dosis de piridostigmina en las tres etapas en que se dividió el estudio; es lo que se acostumbra llamar "respuesta positiva a los anticolinesterásicos". En la Figura 3, dedicada a analizar la magnitud de dicha respuesta, se comprueba que ella es mayor en Dt que en A. La hipótesis de la recuperación de la población de receptores luego de la plasmaféresis, ofrece una explicación aceptable para tal observación. La reacción entre la acetilcolina y el receptor nicotínico da como producto un complejo que se comporta como un canal permeable a los cationes monovalentes, especialmente el sodio, que al entrar a la célula impulsados por su gradiente electroquímico producen la despolarización localizada de la membrana postsináptica, que es la base de la transmisión neuromuscular. Desde el punto de vista cuantitativo, esta reacción cumple con la ley de acción de masas. Tanto en A como en Dt la administración de una dosis de piridostigmina aumenta la cantidad de acetilcolina disponible en la hendidura sináptica para reaccionar con los receptores, pues esta droga inhibe a la enzima acetilcolinesterasa, que es la inactivadora por hidrólisis del neurotransmisor; al haber más receptores disponibles en la etapa Dt que en la etapa A, tal acetilcolina extra produce mayor cantidad de complejos acetilcolina-receptor y, en consecuencia, más eficiencia en la transmisión neuromuscular y mayor fuerza.

De las objeciones que se han hecho al tratamiento de los pacientes con MG mediante plasmaféresis [7], la principal es el costo; sin embargo, dicho gasto es menor que el que suelen ocasionar estos pacientes cuando se hallan severamente incapacitados por su enfermedad y obligados a in-

ternarse repetida y prolongadamente en salas de terapia intensiva para recibir asistencia respiratoria mecánica. Por lo tanto, desde un punto de vista de política sanitaria, probablemente resulte más conveniente adoptar esta nueva modalidad terapéutica de un modo análogo a la elección del transplante renal sobre la diálisis crónica en los enfermos con insuficiencia renal crónica.

Otra objeción que se ha hecho es la transitoriedad de los resultados [14]. En nuestra experiencia, el seguimiento durante alrededor de un año de los pacientes mencionados en este trabajo, ha mostrado que tres de ellos mantuvieron la mejoría lograda con la plasmaféresis bajo inmunosupresión permanente con metilprednisolona y azatioprina; otro paciente abandonó la inmunosupresión y recayó, recuperándose parcialmente con corticoides solamente; otro, pese a recibir adecuadamente las drogas inmunosupresoras, recayó en sus síntomas pero quedando en un estado mejor que el que tenía antes de las plasmaféresis, y el sexto caso, que también tomó adecuadamente los inmunosupresores, también recayó pero se recuperó completamente luego de que en su localidad de residencia le hicieron 6 pequeñas plasmaféresis de 250 ml cada una. Por lo tanto, opinamos que los resultados logrados con la plasmaféresis persisten a través del tiempo, al menos parcialmente, en tanto se mantenga la inmunosupresión. Sin embargo, el corto período de seguimiento y el carácter recurrente de la enfermedad hacen que estas conclusiones deban ser tomadas con reservas.

En nuestra experiencia, no hemos tenido inconvenientes severos al realizar las plasmaféresis, con la única excepción del empeoramiento que muestran inicialmente los enfermos y que puede llevarlos a la incapacidad ventilatoria; por ese motivo, los pacientes deben estar internados durante el tratamiento y se deben tener preparados los medios para prestarles asistencia respiratoria mecánica en caso de necesidad. Con respecto a las alteraciones que las plasmaféresis inducen en la química sanguínea, la Figura 4 muestra que existiendo una buena función renal v hepática los parámetros principales se recuperan rápidamente. En nuestro trabajo no realizamos estudios serológicos para constatar la transmisión de enfermedades infecciosas como la hepatitis, Chagas, toxoplasmosis, etc. Sin embargo, en el período de seguimiento hasta el presente no hubo evidencias de ninguna de ellas. Tampoco hemos tenido hasta ahora complicaciones atribuibles a la inmunosupresión.

Como corolario de lo expuesto, opinamos que la plasmaféresis es un tratamiento que aunque no está exento de riesgos y sus resultados a largo plazo no son siempre óptimos, es la única opción útil que existe en pacientes que continúan gravemente enfermos pese a recibir medidas terapéuticas convencionales. También se la debe considerar en pacientes que han sufrido una crisis paralítica y se encuentran en respirador si su situación no se puede superar en un lapso de 48-72 h mediante el ajuste de la dosis de anticolinesterásicos, ya que los riesgos y costos de la asistencia respiratoria mecánica prolongada superan los de la plasmaféresis.

Resumen

Se estudiaron 6 pacientes con miastenia grave que se hallaban seriamente incapacitados pese a estar medicados con dosis adecuadas de piridostigmina y corticoides y a haber sido timectomizados. Se les realizaron entre 5 y 8 plasmaféresis de 1000 a 1750 ml a cada uno mediante la técnica de exanguineotransfusión reutilizando los eritrocitos del propio paciente suspendidos en 50 % de solución fisiológica más 50 % de plasma humano liofilizado. La capacidad vital media del grupo subió de 1479 ml a 2248 luego de las plasmaféresis (Figura 1); la fuerza de prehensión con las manos de 100 mm Hg a 164; el tiempo máximo de abducción de los miembros superiores de 14.2 seg a 46.4, y el tiempo de elevación de los inferiores de 5.7 seg a 32.8; todas estas diferencias son significativas para una $p < 0.01$. También mejoró significativamente la respuesta a los anticolinesterásicos, calculada a partir de la diferencia entre las determinaciones hechas antes de la administración de una dosis de piridostigmina y las realizadas 1 ½ h después (Figura 3). Estos resultados pueden

ser explicados a partir de una recuperación de la población de receptores nicotínicos secundaria al descenso del título de anticuerpos antirreceptor inducido por la plasmaféresis. Previamente a la mejoría descripta, se comprobó un empeoramiento inicial estadísticamente significativo de la fuerza de todos los grupos musculares estudiados, que se atribuye al aclaramiento plasmático de piridostigmina que también induce la plasmaféresis. Los parámetros bioquímicos sanguíneos básicos no fueron alterados por el intercambio de plasma (Tabla 1).

Summary

PLASMAPHERESIS IN MYASTHENIA GRAVIS.

This study was performed in 6 patients suffering of myasthenia gravis who were severely disabled despite adequate doses of pyridostigmine and corticosteroids and previous thymectomy. Five to eight plasmapheresis, 1000 to 1750 ml in volume, were performed on each one. The exsanguineous transfusion technique was used suspending the shed patient's own red blood cells in 50 % saline and 50 % lyophilized human plasma. We repeatedly assessed vital capacity (FVC), grasping force (FP), abduction time (TA) and lifting time (TE) in the four limbs during periods of time ranging from 4 to 17 days before plasmapheresis began, and 12 to 17 days thereafter; all the measurements were matched before giving pyridostigmine and an hour and a half after it, to appreciate the effects of anticholinesterasic drugs. No change was introduced in the drug regimen during plasmapheresis except for the addition of azathioprine (2 mg/kg/day). The results obtained were subdivided in 3 groups: a) *before plasmapheresis (A);* b) *immediately after plasmapheresis (Dp) which includes the first three days, and* c) *delayed response to plasmapheresis (Dt) from the fourth day on. Mean FVC increased from 1479 ± 93 ml to 2248 ± 88 after plasmapheresis (Fig. 1); FP increased from 100 ± 12 mm Hg to 164 ± 15; TA changed from 14.2 ± 2.1 seg to 46.7 ± 4.4 and TE from 5.7 ± 1.3 seg to 32.8 ± 3.9. All these differences were statistically significant ($p < 0.01$) between A and Dt. Figure 2 shows significant worsening of the parameters measured during Dp. The response to anticholinestorasic drugs was markedly improved when differences between the measures performed before and after pyridostigmine were considered (Fig 3). The results can be explained as a recovery of the population of muscle nicotinic receptors secondary to the decrease in the titer of antireceptor antibodies induced by the procedure. An initial worsening in the force of all muscle groups studied was found previous to the described improvement; it was attributed to the pyridostigmine clearance induced by the plasmapheresis. Blood biochemical parameters were not altered by the plasma exchange (Table 1).*

Bibliografía

1. Bystryn JC, Graf MW, Uhr JW: Regulation of antibody formation by serum antibody. II. Removal of specific antibody by means of exchange transfusion. *J Exp Med* 132: 1279, 1970.
2. Dahlbäck O, Elmqvist D, Johns TR, Radner S, Thesleff S: An electrophysiological study of the neuromuscular junction in myasthenia gravis. *J Physiol* 156: 336, 1961.
3. Dau PC, Lindstrom JM, Cassel CK, Denys EH, Shev EE, Spitler LE: Plasmapheresis and immunosuppressive drug therapy in myasthenia gravis. *N Engl J Med* 297: 1134, 1977.
4. Engel AG, Lambert EH, Howard FM Jr: Immune complexes (IgG, C 3) at the motor end plate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic correlations. *Mayo Clin Proc* 52: 267, 1977.
5. Fambrough D, Drachman DB, Satyamurti S: Neuromuscular junction in myasthenia gravis: decreased acetylcholine receptors. *Science* 182: 293, 1973.
6. Finn R, Coates PM: Plasma exchange in myasthenia gravis. *Lancet* 1: 190, 1977.
7. Keesey J: Caution on plasmapheresis for myasthenia gravis. *N Engl J Med* 298: 1029, 1978.
8. Keesey J, Lindstrom JM, Cokely H: Anti-acetylcholine receptor antibody in neonatal myasthenia gravis. *N Engl J Med* 296: 55, 1977.
9. Kotsias BA, Muchnik S: Myasthenia gravis. Fisiopatología. *Medicina (Bs Aires)* 36: 480, 1976.

10. Lanari A: Myasthenia gravis y transmisión química neuromuscular. *Rev Soc Arg Biol* 13: 239, 1937.
11. Lindstrom JM, Seybold MD, Lennon VA: Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: prevalence, clinical correlates and diagnostic value. *Neurology (Minneap)* 26, 1054, 1976.
12. Lison L: Estadística aplicada a la biología experimental. Buenos Aires. Eudeba, 1976.
13. Mertens HG, Hertel G: Immunodepressive Behandlung der Myasthenia. *Med Welt* 24: 955, 1973.
14. Newson-Davis J, Vincent A, Wilson SG, Ward CD: Long term effects of repeated plasma exchange in myastenia gravis. *Lancet* 3: 464, 1979.
15. Osserman KE: Myasthenia gravis. New York. Grune-Stratton, 1958.
16. Papatestas AE, Alpert LI, Osserman KE: Studies in myasthenia gravis: effects of thymectomy; results on 185 patients with non-thymomatous myasthenia gravis, 1941-1969. *Am J Med* 50: 465, 1971.
17. Patrick J, Lindstrom JM: Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* 180: 871, 1973.
18. Pinching AJ, Peters DK, Davis JN: Remission of myasthenia gravis following plasma-exchange. *Lancet* 2: 1373, 1976.
19. Tokya KA, Drachman DB, Griffin DE: Myasthenia gravis: study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. *N Engl J Med* 296: 125, 1977.
20. Walker MB: Treatment of myasthenia gravis with physostigmine. *Lancet* 1: 1200, 1934.
21. Wekerle H, Paterson B, Ketelson VP: Feldman M: Striated muscle fibers differentiate in monolayer cultures of adult thymus reticulum. *Nature (Lond)* 256: 493, 1975.

— — — —

De puro sabido se olvida que la representación del mundo no es idéntica en los hombres, porque no son idénticos ni sus ambientes ni las formas de su espíritu, hijas de un proceso de ambientes. Pero si todas las representaciones son diferentes, todas se reducen a la unidad, que si no los hombres no se entenderían, y esa unidad fundamental de las distintas representaciones humanas es la que hace posible el lenguaje y con éste la ciencia.

Miguel de Unamuno (1864-1936)
En torno al casticismo, 1916

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 520-530 (1981)

ALTERACIONES MITOCONDRIALES HEPATICAS EN LA DIABETES CRONICA POR ESTREPTOZOTOCINA O PANCREATECTOMIA *

J. A. BRIGNONE **, CLARA M. CAMPOS DE BRIGNONE, BLANCA N. BADANO, R. R. RODRIGUEZ **, A. O. M. STOPPANI **

Instituto de Química Biológica, Instituto de Fisiología Bernardo A. Houssay, Centro de Investigaciones Bioenergéticas (CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La diabetes es una enfermedad metabólica caracterizada por una deficiente utilización de la D-glucosa, lo que origina la necesidad de oxidar ácidos grasos, acetil-CoA y aminoácidos para satisfacer las necesidades energéticas del organismo. Esas oxidaciones tienen lugar en el sistema mitocondrial. No llama entonces la atención que la influencia de la diabetes sobre las mitocondrias hepáticas hayan merecido la atención de numerosos investigadores. Los parámetros examinados han sido varios, a saber, la ultraestructura [24-26], la composición de las membranas mitocondriales [31, 51]; el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa [5, 7, 11, 12, 24-26, 32, 33, 40, 49]; el contenido en citocromos [25, 26] y la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos [26]. Las técnicas empleadas, los órganos de los cuales provenían las mitocondrias, el tipo y la duración de la diabetes y los animales utilizados han variado de una investigación a otra, lo que explica la disparidad de los resultados. Una alteración reiteradamente observada en las mitocondrias hepáticas de animales diabéticos es la disminución de la actividad de la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa (HBD) (Roldán y col. [43], Bedetti y col. [4], Vidal y col. [50, 51] y Brignone y col. [11, 12]. Esta enzima se inserta en la membrana mitocondrial interna, situación que le permite actuar como indicador sensible de las propiedades de la misma, en particular de la "fluidez" de la fase hidrofóbica [44]. De los resultados de Vidal y col. [50, 51] se puede inferir que la disminución de la actividad de la HBD dependería, al menos en parte, de la modificación de los ácidos grasos en los fosfolípidos mitocondriales, especialmente de la fosfatidilcolina. Las oscilaciones del volumen mitocondrial, dependientes del transporte de iones a través de la membrana interna, constituyen un método novedoso para investigar la "fluidez" de esa membrana [6, 21] pues se ha demostrado que esa propiedad se modifica según la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos mitocondriales [47, 54]. En el presente trabajo hemos puesto de prueba la utilidad de este método con mitocondrias diabéticas, tomando la acti-

Recibido: 8-IV-1981. Aceptado: 13-V-1981.

* Trabajo presentado en la XXV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mendoza, noviembre, 1980.

** Miembro de la Carrera del Investigador CONICET, (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Dirección postal: Instituto de Química Biológica, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina.

vidad de la HBD como testigo de la alteración mitocondrial. Se utilizaron dos procedimientos para inducir la diabetes, a saber la inyección de estreptozotocina y la pancreatectomía subtotal amplia. La estreptozotocina daña en forma rápida y específica las células β de los islotes de Langerhans, mientras que la pancreatectomía subtotal produce una diabetes de evolución lenta, en la que la deficiencia de insulina se acompaña de la del glucagón y la somatostatina.

Material y métodos

Ratas. El grupo de ratas diabéticas por estreptozotocina estaba constituido por ratas blancas macho de 160-180 g de peso, del bioterio del Instituto de Fisiología. Se inyectaron, por vía intravenosa y bajo anestesia etérea con estreptozotocina (40 mg/kg) disuelta en solución de citrato de pH 4.5 preparada 3-5 minutos antes de la inyección; los testigos se inyectaron solamente con solución de citrato. El grupo de ratas diabéticas por pancreatectomía estaba constituido por ratas blancas macho del mismo origen, sometidas a pancreatectomía subtotal amplia [19], cuando pesaban 100 g. Después de 4 a 10 meses de diabetes (glucemias en ayuno entre 2.5-4.0 g/l; 300 g de peso) se dividieron en 2 grupos: 1) testigos diabéticos y 2) diabéticas tratadas con insulina. Estas últimas, lo mismo que ratas normales, recibieron insulina NPH porcina, por vía subcutánea, en dos inyecciones diarias cada 12 horas, de 5 unidades cada una, durante 3 días. Fueron sacrificadas en la mañana del cuarto día, después de recibir una dosis adicional de insulina. Las ratas tenían libre acceso a una dieta balanceada (Forramez o Purina) e ingerían agua *ad libitum*. Como testigos se utilizaron animales normales de aproximadamente igual edad y peso, mantenidas en las mismas condiciones que las diabéticas.

Métodos analíticos. La glucemia de las ratas inyectadas con estreptozotocina se determinó por el método de Nikkila y Hyvarinen [39] y la de las ratas pancreatoprivas por el Dextrostix de Ames, después de 7 horas de ayuno. Los cuerpos cetónicos se midieron por el keto-diastix de Ames. La concentración de proteína se midió según Gornall y col. [22].

Preparación de mitocondrias. Se realizó según Goch y Packer [21].

Medida de la respiración mitocondrial; medida de la actividad de HBD; reactivos. Se realizaron según las técnicas empleadas por Brignone y col. [9-12]. La actividad de la HBD se midió después de congelar y descongelar las mitocondrias 4 veces. La succinato deshidrogenasa [3], la NADH deshidrogenasa [42], la citocromo oxidasa [46] y la adenosinatrifosfato fosfatasa [30] (ATPasa) se midieron según las técnicas descriptas en las referencias correspondientes. Para la determinación de ortofosfato se empleó el método de Fiske y Subbarow [17]. Los reactivos fueron los mismos que los utilizados por Brignone y col. [9-12], a los que se deben agregar valinomicina, de Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo., insulina NPH, de E. Lilly & Co., Argentina, y estreptozotocina de Upjon International, Kalamazoo, Mich.

Medida de las oscilaciones del volumen mitocondrial. Se utilizó la técnica de Gooch y Packer [21]. El medio de reacción contenía sacarosa 0.1 M, acetato (K) 28.6 mM; valinomicina 14 ng/ml; Tris-HCl 10 mM, pH 7.9 y rotenona 0.4 μg/mg de proteína. Se colocó 3 ml de medio en la celda del espectrofotómetro, termostatizada a 30° C; se añadió la suspensión mitocondrial (2.0-1.9 mg de proteína) y se iniciaron las oscilaciones agregando succinato-Tris 3.3 mM como fuente de energía. La turbiedad (absorción óptica) de la suspensión mitocondrial se midió a 520 nm en un espectrofotómetro Gilford modelo 2000, acoplado a un potenciómetro registrador.

Resultados

Diabetes y actividad de la HBD. La inyección de estreptozotocina produjo diabetes en forma rápida alcanzando la glucemia de las ratas valores superiores a 2 g/l, en 1-2 días. En cambio, en las ratas pancreatoprivas, la diabetes se desarrolló lentamente de manera que fue necesario utilizar ratas operadas varios meses antes, con glucemia superior a 2.5 g/l.

En contraste con la evolución rápida de la diabetes después de la estreptozotocina, la actividad de la HBD sufrió una variación bifásica (Tabla 1). Durante la pri-

TABLA 1. — *Evolución de la actividad de la HBD en la diabetes por estreptozotocina* *

Tiempo después de la inyección de estreptozotocina	Ratas	Actividad de la HBD (nmol/NAD+/min / mg de proteína)	Variación (%)
6	Testigo	70 ± 7.48 [a]	+ 164
	Diabéticas	185 ± 26. 1 [b]	
15	Testigo	86 ± 8.83 [c]	+ 76
	Diabéticas	152 ± 27. 7 [d]	
18	Testigo	70 ± 6.03 [a]	— 11
	Diabéticas	62 ± 4.54 [b]	
21	Testigo	77 ± 7.07 [a]	— 54
	Diabéticas	35 ± 3.46 [b]	
45	Testigo	73 ± 3.62 [a]	— 59
	Diabéticas	31 ± 3.72 [b]	

* Las condiciones experimentales se describen en el texto. Las cifras representan el valor promedio ± error standard (lotes de 3 ratas).

Análisis de variancia (entre paréntesis, el par de valores comparados: (**a, b**): $p < 0.001$; (**c, d**): $p < 0.02$.

TABLA 2. — *Actividad de la HBD y oxidación de 3-hidroxibutirato por mitocondrias normales y diabéticas* *

Tratamiento de las ratas (número)	Actividad de la HBD (nmol/NAD+/min / mg de proteína)	Respiración mitocondrial (ng átomo O/min/mg de proteína) Estado "3" (A)	Estado "4" (B)	Control respiratorio (A/B)	P : O
Testigos (6)	50 ± 10.7 a	53 ± 6.5 d	15 ± 1.17 g	3.4 ± 0.25 i	2.8 ± 0.72
Pancreatectomía (6)	24 ± 5.6 b	31 ± 8.5 e	14 ± 1.41	2.2 ± 0.25 j	2.6 ± 0.64
Estreptozotocina (6)	24 ± 6.8 c	31 ± 1.8 f	13 ± 1.79 h	2.4 ± 0.20 k	2.9 ± 0.41
Pancreatectomía + insulina (4)	51 ± 1.0	54 ± 9.1	13 ± 2.64	4.6 ± 0.49	2.9 ± 0.46

* Las condiciones experimentales se describen en el texto. Las cifras representan el valor promedio ± error standard. **Análisis de variancia** (entre paréntesis el par de valores comparados): (**a, b**), (**a, c**), (**d, e**), (**d, f**), (**i, j**): $p < 0.001$; (**g, h**), (**i, k**): $p < 0.05$.

mera semana, la actividad fue superior a la normal, disminuyendo luego en forma progresiva para alcanzar el valor mínimo (50 % de la actividad de los testigos) entre 3 y 4 semanas después de la inyección de estreptozotocina.

La Tabla 2 muestra la actividad de la HBD y la respiración en mitocondrias de ratas; 1) normales; 2) diabéticas; 3) diabéticas por estreptozotocina, y 4) pancreatoprivas tratadas con insulina. En todos los casos las mitocondrias se rompieron por congelamiento-descongelamiento (4 veces) para poner en evidencia la actividad enzimática. Se puede ver que la HBD disminuyó en igual proporción en las ratas diabéticas por estreptozotocina y por pancreatectomía. En cuanto a la respiración de las mitocondrias intactas, la disminución en los dos grupos de ratas diabéticas fue también similar y paralela a la disminución de la actividad de la HBD. Como consecuencia de esa variación, el cociente entre la respiración en estado "3" (respiración activada por ADP) y en estado "4" (respiración controlada) fue menor. En cambio la relación P : O mantuvo su valor normal. La Figura 1 muestra trazados polarográficos típicos. El tratamiento con insulina durante tres días, como se indica en la Tabla 2 restableció la actividad de la HBD y de la respiración mitocondrial a sus valores normales.

La Tabla 3 muestra la actividad de la citocromo oxidasa, la succinato deshidrogenasa y la NADH-deshidrogenasa de las

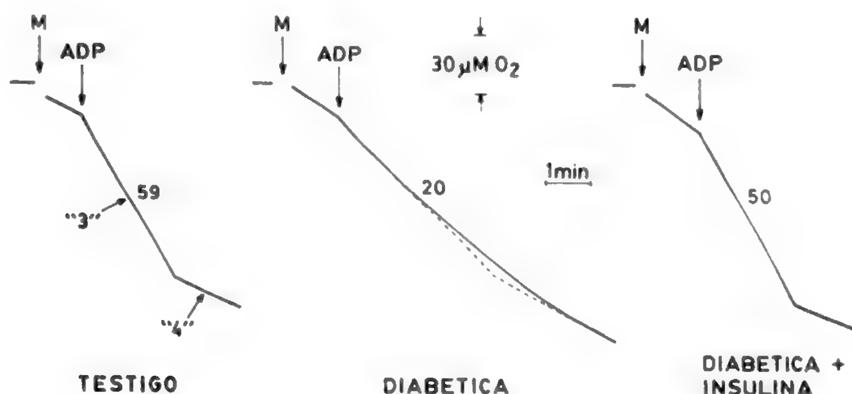


Fig. 1. — Respiración de mitocondrias de hígado de ratas testigo, diabéticas pancreatoprivas y diabéticas tratadas con insulina. El medio de reacción (2 ml) contenía sacarosa 0.24 M; ClK 34 mM; Cl_2Mg 5 mM; etilendiamina-tetraacetato (EDTA) 0.9 mM; Tris-ClH 9 mM; PO_4HK_2-PO_4H_2K (pH 7.4) 6 mM y DL-3-hidroxibutirato (Na) 6 mM. Se agregó la suspensión mitocondrial (1.4 mg de proteína en todos los casos) y luego ADP 0.40 mM. Los números a la derecha de los trazados representan la actividad respiratoria en ng átomo de O/min/mg de proteína. "3" y "4" corresponden a los estados metabólicos de respiración activa y respiración controlada, respectivamente. Otras condiciones experimentales, según Material y métodos. La concentración inicial de oxígeno era 0.22 mM.

TABLA 3. — *Actividad de la citocromo oxidasa, succinato deshidrogenasa y NADH-deshidrogenasa en mitocondrias normales y diabéticas* *

Actividad enzimática	Ratas	
	Testigo	Diabéticas **
Citocromo oxidasa (9)	1.88 ± 0.17 a	3.23 ± 0.26 b
Succinato deshidrogenasa (10)	0.67 ± 0.07	0.73 ± 0.08
NADH-deshidrogenasa (10)	1.95 ± 0.19	1.88 ± 0.27

* Las condiciones experimentales se describen en el texto. Las cifras representan el valor promedio ± error standard en μmoles de sustrato oxidado/min/mg de proteína mitocondrial (entre paréntesis número de ratas). ** Inyectadas con estreptozotocina (65 mg/kg).

Análisis de variancia (entre paréntesis el par de valores comparado): **(a, b)**: $p < 0.01$.

mitocondrias normales y diabéticas. Se comprobó aumento significativo de la citocromo oxidasa, sin variación de las dos deshidrogenasas. En cambio, la actividad de la adenosinatrifosfatasa, en particular la liberada por el 2.4-dinitrofenol disminuyó significativamente (Tabla 4).

Oscilaciones periódicas del volumen mitocondrial. La Figura 2 muestra una oscilación tipo que facilita la descripción del fenómeno. La adición de las mitocondrias (M) al medio de suspensión, que contenía iones K^+ y valinomicina, originó la absorción óptica que muestra la parte inicial del trazado. En el momento indicado por la flecha, se agregó succinato para activar el flujo de electrones en la membrana interna y como consecuencia de ello, se produjo la entrada de K^+ y agua a la matriz mitocondrial, con el consiguiente aumento del volumen. Ese aumento determinó la disminución de la absorción óptica hasta un mínimo y a partir de entonces el volumen mitocondrial osciló en forma

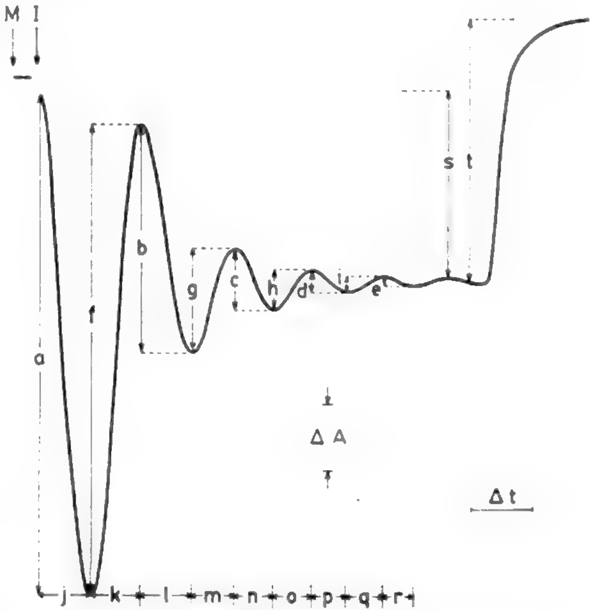


Fig. 2. — Modelo de oscilaciones periódicas del volumen mitocondrial. La absorción óptica inicial de la suspensión se indica por la M en la iniciación del trazado. La adición de la fuente de energía (I) inicia las oscilaciones de la absorción óptica, que expresan las del volumen mitocondrial. Parámetros: **a-e-**, coeficientes de expansión; **f-i**, coeficientes de contracción; **j-r**, duración de semiperíodos; **s**, coeficiente de expansión en estado de equilibrio; **t**, coeficiente de relajación. **ΔA y Δt escalas de absorción óptica y de** tiempo, respectivamente.

TABLA 4. — *Actividad de la ATPasa mitocondrial en ratas diabéticas* *

Adiciones al medio de reacción	Actividad de la ATPasa (μmol P/min/mg de proteína)	
	Testigos	Diabéticas
Ninguno	36 ± 2.2 a	27 ± 3.8 b
Cl_2Mg (5 mM)	46 ± 7.4	64 ± 14
2,4-Dinitrofenol (0.1 mM)	213 ± 12 c	176 ± 13 d

* Incubación durante 10 min a 30° C, en el medio de reacción que contenía sacarosa 50 mM, ClK 75 mM, EDTA 1.0 mM, Tris-ClH 50 mM y ATP(Na) 6 mM; proteína mitocondrial, 1.0 mg; adiciones como se indica; volumen final 1.0 ml. Finalizada la incubación se agregó 1.0 ml de ácido tricloracético 10% (p/v), se eliminó el precipitado por centrifugación y se midió el ortofosfato liberado en 0.5 ml de sobrenadante. Otras condiciones experimentales se describen en el texto. Los valores representan el promedio ± error standard de 5 ratas por grupo.

Análisis de variancia (entre paréntesis, el par de valores comparados): **(a, b)**, **(c, d)**: $p < 0.01$.

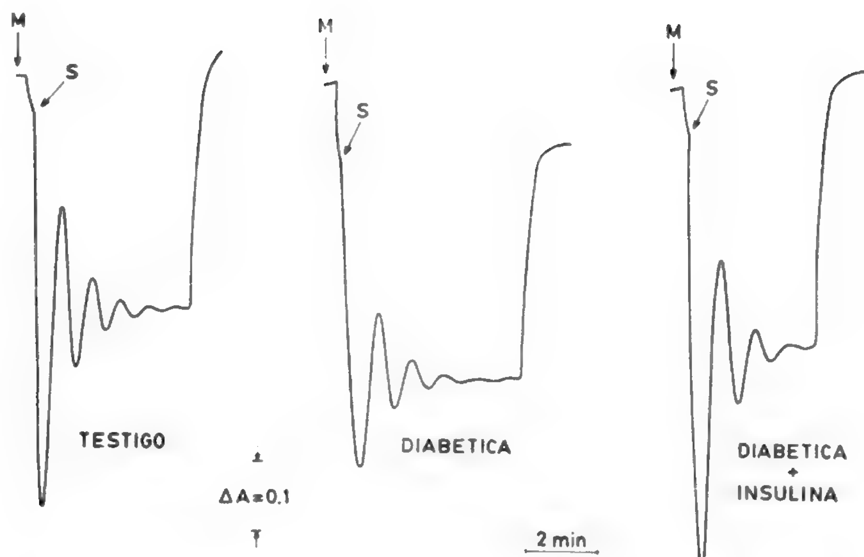


Fig. 3. — Oscilaciones periódicas de mitocondrias de hígado de ratas testigo, diabéticas pancreatoprivas y diabéticas tratadas con insulina. Otras condiciones experimentales como se describen en el texto; cada muestra contenía 2.0 mg de proteína mitocondrial.

periódica. Para expresar numéricamente las variaciones de la absorción óptica se utilizan los siguientes parámetros: 1) amplitud de la expansión (ej., *a*); 2) amplitud de la contracción (ej., *d*); 3) duración del semiperíodo (ej., *g*); 4) disminución del volumen mitocondrial cuando se colapsa el gradiente iónico (relajación, *m*); 6) coeficiente de amortiguación, o sea la disminución de la amplitud de cada oscilación respecto a la precedente (ej., *a/b*). La disminución final del volumen mitocondrial (*m*) se produjo al agotarse el oxígeno en la suspensión. La Figura 3 muestra trazados típicos obtenidos con mitocondrias de ratas: 1) normales, 2) diabéticas y 3) diabéticas tratadas con insulina. La simple inspección permite comprobar diferencias significativas, especialmente en la amplitud de las oscilaciones,

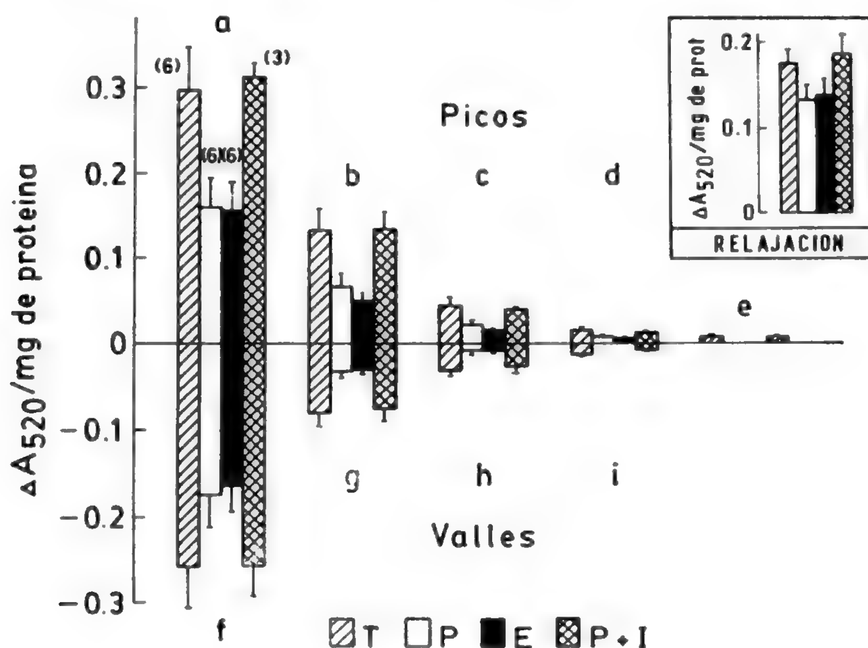


Fig. 4. — Parámetros de expansión (a-e), de contracción (f-i) y de relajación (t) con mitocondrias de ratas testigo (T); diabéticas pancreatoprivas (P); diabéticas por estreptozotocina (E), y diabéticas pancreatoprivas tratadas con insulina (P + I). Condiciones experimentales como en la Figura 3. Las columnas representan el valor promedio y las barras, el error normal; entre paréntesis, el número de muestras examinadas en cada caso.

que fue menor en las mitocondrias diabéticas. En cambio, en las mitocondrias de las ratas diabéticas tratadas con insulina, la amplitud fue normal y el oxígeno se agotó más rápidamente, como lo demuestra el adelanto de la relajación *(m)*, que impidió visualizar la quinta oscilación. Los valores promedio de los coeficientes de expansión y de relajación se presentan en la Figura 4. Se puede ver la disminución significativa de la amplitud (parámetros *a-c*), de la contracción (*f-i*) y del relajamiento (*m*) de las mitocondrias diabéticas. Esas alteraciones fueron corregidas por el tratamiento insulínico. La mitocondria proveniente de las ratas tratadas con estreptozotocina o pancreatoprivas se comportaron de la misma manera. La Figura 5 muestra el aumento de los coeficientes de amortiguación en las ratas diabéticas. A pesar de las modificaciones descriptas, no hubo variación significativa en la duración de los semiperíodos (datos no incluidos).

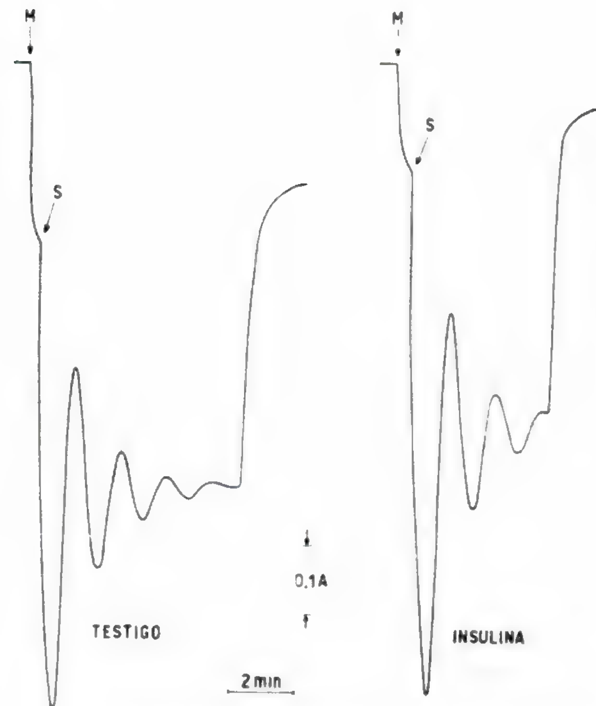


Fig. 6. — Influencia del tratamiento con insulina sobre las oscilaciones periódicas mitocondriales. Condiciones experimentales como en la Figura 3.

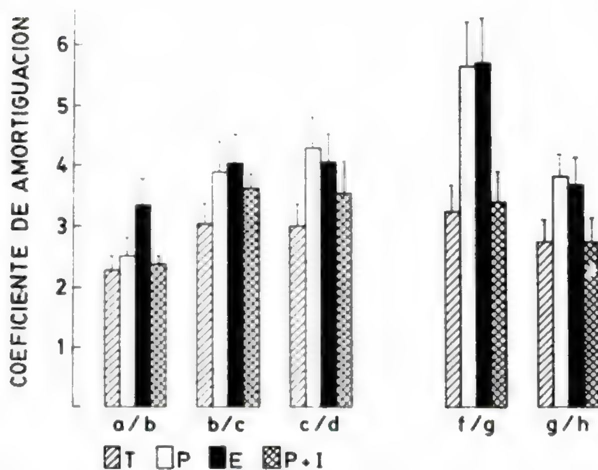


Fig. 5. — Coeficientes de amortiguamiento de las oscilaciones del volumen mitocondrial. Condiciones experimentales como en las Figuras 3 y 4. Los coeficientes se definen en el texto.

Discusión

La disminución selectiva de la actividad HBD en las ratas diabéticas (Tablas 1 y 2) confirma y extiende resultados anteriores de este laboratorio [4, 7, 11, 12]. Esa alteración afecta la actividad respiratoria mitocondrial en forma limitada a la oxidación del 3-hidroxibutirato, pues otros componentes enzimáticos de la cadena respiratoria, como la NADH-deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa, conservaron su actividad normal, o la aumentaron, como la citocromo oxidasa (Tabla 3). A la disminución de la actividad de la HBD (Tablas 1 y 2) se debe agregar la de la ATPasa (Tabla 4) pero esa disminución se manifestó en dos condiciones particulares a saber: en ausencia de Mg^{2+} (que integra el complejo ATP-Mg, verdadero sustrato de la enzima), o en presencia de 2.4-dinitrofenol, que libera la actividad enzimática de sus reguladores naturales. Una disminución similar fue observada por Harano y col.[26] en ratas aloxánicas.

Según Schaffer y Nagel [45] las deshidrogenasas primarias son el factor limitante de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial. Si se compara la actividad específica de la HBD en la membrana mitocondrial con el consumo de 3-hidroxibutirato por las mitocondrias enteras (Tabla 2; cada átomo g de oxígeno equivale a un mol de 3-hidroxibutirato), se obtiene una relación de aproximadamente 1 : 1, que es la que corresponde si toda la HBD de la membrana participara en la oxidación del 3-hidroxibutirato por el oxígeno. En consecuencia, la disminución de la actividad de la HBD en la diabetes de-

termina una menor capacidad mitocondrial para oxidar 3-hidroxibutirato. En cambio, en las mitocondrias del miocardio existe un exceso de HBD [23] y por ello la disminución de la actividad enzimática no afecta la oxidación del 3-hidroxibutirato por esas mitocondrias.

La literatura sobre modificaciones en las mitocondrias hepáticas diabéticas registra las siguientes observaciones (en cada caso se indica el origen de las mitocondrias): 1) disminución del P : O y de la respiración en estado "3", ambos efectos reversibles por insulina [24, 49] (mitocondrias de gatos pancreatoprivos o ratas aloxánicas); 2) aumento de la respiración con P : O normal [5, 32] (mitocondrias de perros pancreatoprivos o de ratas diabéticas por aloxano o estreptozotocina); 3) aumento de la oxidación del palmitato y disminución de la oxidación del 2-cetoglutarato y del succinato, con P : O normal [26] (mitocondrias de ratas aloxánicas); 4) P : O normal [7, 33, 41] (mitocondrias de ratas aloxánicas o pancreatoprivas); 5) disminución de la oxidación de 3-hidroxibutirato, L-malato y L-glutamato, con P : O normal [7] (mitocondrias de ratas pancreatoprivas); 6) disminución de la actividad de la HBD [4, 7, 11, 12, 50, 51] (mitocondrias de perros pancreatoprivos [43], ratas diabéticas por estreptozotocina [4, 11, 12, 50, 51], o pancreatoprivas [7]); 7) disminución de la actividad del citocromo aa_3 y de la citocromo oxidasa [26] (mitocondrias de ratas aloxánicas); 8) modificación de la forma y tamaño mitocondrial [24-26]. Con respecto a las mitocondrias de músculo, Haugaard y col. [28], Haugaard y Haugaard [27] y Armstrong y Ianuzzo [2], comprobaron disminución de la fosforilación y de la succinato deshidrogenasa en homogenados de músculo diabético, mientras que Dow [14], Favelukes y col. [15, 16] y Grinblat y col. [23], no hallaron alteraciones de la respiración y del P : O con mitocondrias aisladas evitando los efectos inhibidores de ácidos grasos y sus derivados. Los resultados en la Tabla 2 tampoco indican alteraciones del P : O y en cuanto a la respiración, su disminución se justifica por la menor actividad de la HBD. La multiplicidad de los efectos descriptos en la literatura permite inferir que no son consecuencia directa de la deficiencia de insulina, sino: 1) de una alteración metabólica general, o 2) de la acción hepatotóxica del aloxano, frecuentemente utilizado para inducir la diabetes. Con respecto a la primera posibilidad conviene tener en cuenta que en la diabetes se liberan los ácidos grasos del tejido adiposo, lo que determina su acumulación y la de sus ésteres (con coenzima A) en las mitocondrias hepáticas. Se sabe que los ácidos grasos y sus derivados son inhibidores o "desacoplantes" de la fosforilación oxidativa [25, 26, 31], lo que explicaría las alteraciones mitocondriales diabéticas. Una vez agotadas las reservas de triglicéridos en el tejido adiposo, los ácidos grasos disminuyen en el hepatocito y como consecuencia de ello, las alteraciones mitocondriales desaparecen espontáneamente 3 semanas después de iniciada la diabetes [26].

Las oscilaciones periódicas del volumen mitocondrial son fenómenos osmóticos, dependientes de la translocación de iones, en especial K^+, a través de la membrana interna [6, 21]. Son precedidas por variaciones paralelas del transporte de electrones en la cadena respiratoria y también de la fosforilación oxidativa, en particular de la relación ATP/ADP [6]. La amplitud de las oscilaciones parece depender de la movilidad del transportador de K^+ a través de la membrana interna, siendo la velocidad del flujo iónico un factor esencial. Es sabido que en la diabetes disminuye la actividad de la Δ^9 desaturasa [8, 29, 36-38] y como consecuencia de ello, ácidos grasos saturados reemplazan a los ácidos insaturados de los fosfolípidos mitocondriales [31, 51]. Esta sustitución determina una menor "fluidez" (o mayor rigidez) de la membrana interna, que determinaría la menor movilidad del transportador de iones K^+ y la disminución de la amplitud de las oscilaciones. Un hecho que concuerda con esta explicación es la menor actividad de HBD en las mitocondrias diabéticas, pues esta enzima requiere fosfatidilcolina con ácidos grasos insaturados [18, 20, 35, 50-52]. El mecanismo de la disminución de la actividad de la HBD en las mitocondrias de hígado y corazón diabé-

ticos ha sido discutido extensamente por Vidal y col. [51], y por Grinblat y col. [23].

La estreptozotocina, lo mismo que el aloxano, es un tóxico selectivo para las células β de los islotes de Langerhans pero también tienen efectos secundarios, en particular sobre el hepatocito [1]. Las alteraciones mitocondriales después de la estreptozotocina, podrían así imputarse a la acción hepatotóxica y no a la diabetes. En contra de esta interpretación hay dos argumentos importantes, a saber: 1) el desarrollo lento de las alteraciones mitocondriales, en contraste con la rapidez de la acción diabetógena [1], y 2) la aparición de lesiones mitocondriales similares después de la remoción del páncreas. Viceversa, la disminución de la HBD después de la estreptozotocina permite afirmar que esa alteración en las ratas pancreatoprivas se debe a la deficiencia de insulina, y no a la de otras hormonas insulares como el glucagón, la somatostatina y el "polipéptido pancreático". En cuanto al mecanismo por el cual la deficiencia de la insulina produce la modificación de las membranas mitocondriales, la disparidad entre la variación lenta de la HBD, y la disminución rápida de las enzimas relacionadas con la gluconeogenesis, por ejemplo, la piruvato quinasa [53], cuya síntesis controla la insulina, en manera alguna concuerda con una acción directa de la hormona sobre el contenido en HBD de la membrana interna. Por otra parte, los estrógenos y progestinas artificiales, que ejercen su acción por mecanismos totalmente diferentes al de la insulina, también disminuyen la actividad de la HBD [9, 10]. Más razonable parece suponer que las modificaciones mitocondriales en la diabetes son la consecuencia de una alteración metabólica general que afecta la composición de la membrana mitocondrial interna en la cual se inserta la HBD. Estudios recientes de Clejan y col. [13] sobre variaciones de la "fluidez" y la composición en ácidos grasos de la membrana interna de hígado de ratas diabéticas, hipofisoprivas, y de ratas inyectadas con hormona de crecimiento apoyan esta interpretación.

Las modificaciones de la HBD, de la ATPasa Mg-dependiente y las oscilaciones periódicas del volumen mitocondrial indican que en la diabetes hay alteraciones mitocondriales no detectadas hasta ahora. Es sabido que el hígado es el principal productor de cuerpos cetónicos, especialmente 3-hidroxibutirato [34], que se utilizan en los tejidos extrahepáticos como material energético, en lugar de la glucosa. Queda por establecer la importancia de las lesiones mitocondriales descriptas para el metabolismo de los cuerpos cetónicos.

Resumen

La diabetes crónica en la rata por inyección de estreptozotocina provoca alteraciones en las mitocondrias hepáticas consistentes en la disminución de la actividad de la 3-hidroxibutirato deshidrogenasa (HBD) y de las oscilaciones periódicas amortiguadas del volumen mitocondrial provocadas por la adición de K^+ en presencia de valinomicina y succinato. En este trabajo se han investigado los mismos parámetros, y también el transporte de electrones, la fosforilación oxidativa y la actividad de la ATPasa en mitocondrias de ratas pancreatoprivas (4-10 meses de diabetes; glucemia 2.5-4.0 g/l). Observaciones paralelas se realizaron con ratas inyectadas con estreptozotocina (40 mg/kg; dosis única). Valores típicos de la HBD (en nmol NAD^+ reducido/min/mg proteína; promedio $\pm$ error standard; entre paréntesis número de ratas) fueron los siguientes: testigos 50 $\pm$ 10.7 (6); diabéticas (pancreatectomía) 24 $\pm$ 5.6 (6); diabéticas (estreptozotocina) 24 $\pm$ 6.8 (6). La actividad respiratoria de las mitocondrias diabéticas incubadas con 3-hidroxibutirato disminuyó significativamente (42 %) y también disminuyó la actividad de la ATPasa mitocondrial. Las oscilaciones periódicas amortiguadas de las mitocondrias diabéticas sufrieron alteraciones paralelas a las de la HBD, con disminución de amplitud, aumento de amortiguación y disminución del relajamiento. Todas las alteraciones mitocondriales de las ratas diabéticas se corrigieron por el tratamiento insulínico (insulina NPH por inyección subcutánea, 5 unidades, dos veces por día, durante 3 días consecutivos, reforzada por la misma

dosis 45 min antes del sacrificio). Las ob servaciones reseñadas demuestran que las lesiones mitocondriales posteriores a la inyección de estreptozotocina son imputables a la diabetes, no a la hepatotoxicidad del antibiótico y viceversa, las lesiones posteriores a la pancreatectomía dependen de la deficiencia de insulina.

Summary

ALTERATIONS IN LIVER MITOCHONDRIA AFTER STREPTOZOTOCIN INJECTION OR PANCREATECTOMY IN RATS.

Streptozotocin diabetes is known to cause the following alterations in rat liver mitochondria: a) *decrease of D-(—)-3-hydroxybutyrate de hydrogenase (HBD) activity;* b) *decrease of D-(—)-3-hydroxybutyrate oxidation by intact mitochondria, and* c) *decrease of mitochondrial oscillations induced by K^+ ions in the presence of valinomycin. In order to establish whether mitochondrial alterations following streptozotocin were due to insulin deficiency and not to the antibiotic hepatotoxic effect, the above mentioned parameters were investigated in adult male white rats rendered diabetic by extensive subtotal pancreatectomy, performed 4-10 months before (glycemia 2.5-4 g/l). When necessary, control experiments were performed with streptozotocin rats. Succinate dehydrogenase, NADH-dehydrogenase, cytochrome oxidase and Mg-ATPase were also measured in the diabetic mitochondria. In both depancreatized and streptozotocin rat mitochondria, a significant decrease was observed of HBD activity, 3-hydroxybutyrate oxidation, ATPase activity (DNP stimulated) and mitochondrial oscillations. Typical values for HBD activity (in nmol NAD^+ reduced/min/mg mitochondrial protein; mean ± standard error; in parenthesis number of rats) were: control rats, 50 ± 10.7(6); diabetic rats (depancreatized), 24 ± 6.8(6); diabetic rats (streptozotocin), 24 ± 5.6(6). Mitochondrial respiration values (in ng atom O/min/mg mitochondrial protein; 3-hydroxybutyrate as substrate) were: control rats, 53 ± 6.5(6); diabetic rats (depancreatized), 31 ± 8.5(6); diabetic rats (streptozotocin), 31 ± 1.8(6). No significant differences could be detected in the P : O values. Variation of HBD after streptozotocin injection followed a biphasic course, with an increase between the 6th and 15th day, normal activity at the 18th day and decreased activity after 21-45 days. Concerning other enzyme activities, there was a significant increase (about two-fold) of cytochrome oxidase and an 18 % decrease of the ATPase activity, but succinate and NADH-dehydrogenase did not vary. Periodic (damped) oscillations of mitochondrial volume, measured by light absorption at 520 nm, showed modifications in diabetic mitochondria. A significant decrease was observed of amplitude (33-77 %); an increase of the damping factor and a decrease of the relaxation factor. Treatment of diabetic rats with NPH insulin (3 IU twice daily, during 3 days, reinforced by the same dosis 45 min before sacrifice) restablished normal values for HBD activity, the rate of 3-hydroxybutyrate oxidation by mitochondria and the oscillatory response. It is concluded that the mitochondrial alterations induced by streptozotocin do not depend on an hepatotoxic effect, while the similar lesions resulting from pancreatectomy are caused by insulin deficiency.*

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado con subsidios del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), la SECYT (Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología) y la Oficina de Investigaciones Científicas de la Organización de Estados Americanos (OEA), Programa Multinacional de Bioquímica. Se agradece a Upjohn International Inc. Kalamazoo, Michigan, y a E. Lilly and Co, Indianapolis, la donación de estreptozotocina e insulina NPH, respectivamente.

Bibliografía

1. Agarwal MK: Streptozotocin: mecanism of action. *FEBS Lett* 120: 1, 1980.
2. Armstrong RB, Ianuzzo CD: Decay of succinate dehydrogenase activity in rat skeletal muscle following streptozotocin injection. *Horm Metab Res* 8: 392, 1976.
3. Arrigoni O: Singer TP: Limitations of phenazine methosulphate assay for succinic and related dehydrogenases. *Nature* 193: 1256, 1962.
4. Bedetti CD, Anzola MG, Stoppani AOM: Contralor endocrino de niveles enzimáticos

e intercambios iónicos en mitocondrias. *Acta Physiol Latinoamer* 23: Resumen Nº 299, 1973.
5. Beyer RE, Shamoian CA: Oxidative phosphorylation and related reactions in liver mitochondria from diabetic dogs. *Am J Physiol* 200: 838, 1961.
6. Boiteux A, Hess B: Oscillations in glycolysis, cellular respiration and communication. Faraday Symposia of the Chemical Society Nº 9. Physical Chemistry of Oscillatory Phenomena, The Faraday Division, Chemical Society, London, p 202, 1974.
7. Boveris AA, Cattaneo de Peralta Ramos M, Stoppani AOM, Foglia VG: Phosphorylation, oxidation, and ubiquinone content in diabetic mitochondria. *Proc Soc Exp Biol Med* 132: 171, 1969.
8. Brenner RR: The oxidative desaturation of unsaturated fatty acids in animals. *Mol Cell Biochem* 3: 41, 1972.
9. Brignone JA, Brignone CMC de, Gamboni M, Koch O, Stoppani AOM: Alteraciones mitocondriales hepáticas en la rata por tratamiento con anovulatorios orales. *Medicina (Bs Aires)* 38: 413, 1978.
10. Brignone JA, Brignone CMC de, Dávila MTG, Koch O, Stoppani AOM: Acción hepatóxica en la rata de dos esteroides anovulatorios mestranol y acetato de noretisterona. *Medicina (Bs Aires)* 39: 477, 1979.
11. Brignone JA, Brignone CMC de, Rodríguez RR, Stoppani AOM: Alteraciones mitocondriales hepáticas en la diabetes crónica. *Medicina (Bs Aires)* 40: 753, 1980.
12. Brignone JA, Brignone CMC de, Stoppani AOM: Alteraciones mitocondriales hepáticas en la diabetes por estreptozotocina en la rata. *Medicina (Bs Aires)* 39: 819, 1979.
13. Cleján S, Collipp PJ, Maddaiah VT: Hormones and liver mitochondria: influence of growth hormone, thyroxine, testosterone, and insulin on thermotropic effects on respiration and fatty acid composition of membranes. *Arch Biochem Biophys* 203: 744, 1980.
14. Dow DS: The isolation from thyrotoxic and diabetic rats of skeletal muscle mitochondria showing light coupling, high respiratory indeces, and normal adenosinetriphosphatase activities. *Biochemistry* 6: 3350, 1967.
15. Favelukes SS de, Tarlovsky MS de, Stoppani AOM: Incorporation of amino acids by isolated rat liver and skeletal muscle mitochondria. *Acta Physiol Latinoam* 21: 30, 1971.
16. Favelukes SS de, Tarlovsky MS de, Bedetti CD, Stoppani AOM: Hormonal effects on mitochondrial protein synthesis. *In:* Gene expression and its regulation. (Kenney FT, Hamkalo BA, Favelukes G, August JT eds), Vol 1, p 539, Plenum Press, New York, London 1973.
17. Fiske CH, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66: 375, 1925.
18. Fleischer S, Bock H-G, Gazzotti P: Studies of phospholipid-protein interaction in D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase, a lecithin requiring enzyme. *In:* Membrane proteins in transport and phosphorylation. (Azzone GF, Klingenberg ME, Quagliariello E, Siliprandi N eds), p 125, North Holland Publ Co, Amsterdam, 1974.
19. Foglia VG: Características de la diabetes en la rata. *Rev Soc Argent Biol* 20: 21, 1974.
20. Gazzotti P, Bock HG, Fleischer S: Role of lecithin in D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase function. *Biochem Biophys Res Commun* 58: 309, 1974.
21. Gooch VD, Packer L: Oscillatory systems in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 346: 245, 1974.
22. Gornall AG, Bardawill CHY, David MM: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751, 1949.
23. Grinblat L, Pacheco LF, Stoppani AOM: Alteraciones mitocondriales en el miocardio de ratas diabéticas. *Medicina (Bs Aires)* 41: 309, 1981.
24. Hall JC, Sordahl LA, Stefko PL: The effect of insulin on oxidative phosphorylation in normal and diabetic mitochondria. *J Biol Chem* 235: 1536, 1960.
25. Harano Y, DePalma RG, Lavine L, Miller M: Fatty acid oxidation, oxidative phosphorylation and ultrastructure of mitochondria in the diabetic rat liver. *Diabetes* 21: 257, 1972.
26. Harano Y, DePalma RG, Miller M: Fatty acid oxidation, citric acid cycle activity, and morphology of mitochondria in diabetic rat liver. *Proc Soc Exp Biol Med* 131: 913, 1969.
27. Haugaard ES, Haugaard N: Diabetic metabolism. I. Carbohydrate utilization and high energy phosphate formation in heart homogenates from normal and alloxan-diabetic rats. *J Biol Chem* 239: 705, 1964.
28. Haugaard N, Marsh JB, Stadie WC: Phosphate metabolism of isolated rat diaphragma. *J Biol Chem* 189: 59, 1951.
29. Jeffcoat R: The biosynthesis of unsaturated fatty acids and its control in mammalian liver. Essays in Biochemistry. The Biochemical Society, London. 15: p 1, 1979.
30. Kielley WW: *En:* Mitochondrial ATPase. Methods in Enzymology. (Colowick SP, Kaplan NO eds), Vol 2, p 593, Academic Press, New York, 1955.
31. Lerner E, Shug AL, Elson C, Shrago E: Reversible inhibition of adenine nucleotide translocation by long chain fatty acyl coenzyme A esters in liver mitochondria of diabetic and hibernating animals. *J Biol Chem* 247: 1513, 1972.
32. Mackerer CR, Paquet RJ, Mehlman MA, Tobin RB: Oxidation and phosphorylation in liver mitochondria from alloxan and streptozotocin diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 137: 992, 1971.
33. Matsubara T, Tochino Y: Depression of respiratory activities in the liver mitochondria of diabetic rats and the restorative action of insulin. *J Biochem (Tokio)* 66: 397, 1969.
34. McGarry JD, Foster DW: Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketonebody

production. *Ann Rev Biochem* 49: 395, 1980.
35. McIntyre JO, Bock H-G, Fleischer S: The orientation of D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase in the mitochondrial inner membrane. *Biochem Biophys Acta* 513: 255, 1978.
36. Mercuri O, Peluffo RO, de Tomás ME: Efect of different diets on the Δ9-desaturase activity of normal and diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 369: 264, 1974.
37. Mercuri O, Peluffo RO, Brenner RR: Effect of insulin on the oxidative desaturation of α-linolenic, oleic and palmitic acids. *Lipids* 2: 284, 1967.
38. Mercuri O, Peluffo RO, Brenner RR: Depression of the microsomal desaturation of linoleic to γ-linolenic acid in the alloxan-diabetic rat. *Biochim Biophys Acta* 116: 409, 1966.
39. Nikkila EA, Hyvarinen A: Specific determination of blood glucose with o-toluidine. *Clin Chim Acta* 7: 140, 1962.
40. Pande SV, Blanchaer MC: Reversible inhibition of mitochondrial adenosine diphosphate phosphorylation by long chain acyl coenzyme A esters. *J Biol Chem* 246: 402, 1971.
41. Parks RE, Adler J, Copenhaver JH: The efficiency of oxidative phosphorylation in mitochondria from diabetic rats. *J Biol Chem* 214: 693, 1955.
42. Ringler RI, Minakami S, Singer TP: Studies on the respiratory chain linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. Isolation and molecular properties of the enzyme from beef heart. *J Biol Chem* 238: 801, 1963.
43. Roldán AG, del Castillo EJ, Boveris A, Garaza Pereira AM, Stoppani AOM: Decreased activity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase in diabetic liver mitochondria. *Proc Soc Exp Biol Med* 137: 791, 1971.
44. Sandermann H: Regulation of membrane enzymes by lipids. *Biochim Biophys Acta* 515: 209, 1978.
45. Schafer G, Nagel L: Action of insulin and triiodothyronine on energy-controlled pathways of hydrogen. *Biochim Biophys Acta* 162: 617, 1968.
46. Smith L: Spectrophotometric assay of cytochrome *c* oxidase. *En:* Methods of Biochemical Analysis. (Glick D ed), Vol 2, p 427, Interscience Publishers Inc, New York, 1955.
47. Stancliff RC, Williams MA, Utsumi K, Packer L: Essential fatty acids in mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 131: 629, 1969.
48. Unger RH, Dobbs RE, Orci L: Insulin, glucagon and somatostatin secretion in the regulation of metabolism. *Ann Rev Biochem* 40: 307, 1978.
49. Vester JW, Stadie WC: Studies of oxidative phosphorylation by hepatic mitochondria from the diabetic rat. *J Biol Chem* 227: 669, 1957.
50. Vidal JC, Guglielmucci E, Stoppani AOM: Modulation of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase activity by membrane lipid. *Fed Proc* 36: 721, 1977.
51. Vidal JC, Guglielmucci E, Stoppani AOM: 3-D-(-)-hydroxybutyrate dehydrogenase from rat liver mitochondria. Purification and interaction with phospholipids. *En:* Advances in Experimental Medicine and Biology. (Bazan NG, Brenner RR, Giusto NM, eds), Vol 83, p 203, Plenum Press, New York, 1977.
52. Vidal JC, Guglielmucci E, Stoppani AOM: Interaction of rat liver 3-D-(-)-hydroxybutyrate apodehydrogenase with phospholipids. *Arch Biochem Biophys* 187: 138, 1978.
53. Weber G, Stamm NB, Fisher EA: Insulin: inducer of pruvate kinase. *Science:* 149: 65, 1965.
54. Williams MA, Stancliff RC, Packer L, Keith AD: Relation of unsaturated fatty acid composition of rat liver mitochondria to oscillation period, spin label motion, permeability and oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 267: 444, 1972.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 531-534 (1981)

ACCION CLASTOGENICA DE UN COMPUESTO ANTRAQUINONICO EN LINFOCITOS HUMANOS

M. A. CARBALLO, M. D'AQUINO, E. I. ARANDA

Centro Nacional de Genética Médica y Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires

Los compuestos antraquinónicos (AQ) tienen una amplia difusión como colorantes alimenticios, cosméticos, fármacos y laxantes. Algunos autores señalan para estos compuestos, acción mutagénica en sistemas microbianos, ya sea en forma directa o previa activación metabólica por sistema microsomal [2]. De 90 compuestos ensayados 9-10 antraquinónicos y derivados antracénicos, 32 fueron hallados mutagénicos sobre *Salmonella typhimurium* en forma directa, y se encontró acción mutagénica en menor escala cuando eran sometidos a activación metabólica previa por sistema microsomal. Trabajando con grupos funcionales, se encontró que los derivados nitrosados fueron todos mutagénicos, siguiéndole los derivados hidroxilados y aminados [2]. Un estudio sobre la absorción intestinal en ratas ha mostrado que un 30 y un 40 % de una dosis de 1-8 AQ podría ser recuperado de orina y heces [4]. Las glicósidas antraquinónicas, siendo polares y de alto peso molecular, son pobremente absorbidas en el intestino delgado, y pasan directamente al intestino grueso antes de poner en circulación sus aglicones [10]. El subsecuente metabolismo de los aglicones antraquinónicos puestos en libertad en el colon, todavía no es claro. La reducción bacteriana de la 1-8 AQ a la antrona correspondiente, ha sido demostrada [6, 9] dando lugar a la teoría de que los principios activos de los catárticos pueden no ser las antraquinosas pero sí las antronas libres y sus antranoles tautoméricos. Este hecho indica que una determinada cantidad de derivados glicosídicos de hidroxiantraquinonas mutagénicas pueden no serlo por sí mismas, pero sí ser convertidas en aglicones mutagénicos por incubación in vitro o con extractos enzimáticos [3]. En este trabajo se presenta un estudio in vitro de la acción clastogénica de un derivado sintético de los compuestos antraquinónicos, la 1-8 Dihidroxiantraquinona y el solvente en el que se solubiliza la misma, el Dimetilsulfóxido, usando como método de ensayo el cultivo de linfocitos humanos.

— — — —

Recibido: 19-XI-1980. Aceptado: 1-IV-1981.

Dirección postal: Centro Nacional de Genética Médica, Combate de los Pozos 2193, 1245 Buenos Aires, Argentina.

Material y métodos

Se realizaron cultivos de linfocitos de sangre periférica humana [1] en medio TC 199, enriquecido con Suero Fetal Bovino al 15 % y empleando Fitohemaglutinina M al 2 % (DIFCO) como agente mitogénico. La 1-8 Dihidroxiantraquinona fue agregada en tres concentraciones finales diferentes: 5, 19 y 30 μg/ml. El cultivo con el solvente se realizó con una concentración final del

TABLA 1. — *Frecuencia de distintos tipos de alteraciones cromosómicas*

Compuesto	Aberraciones cromosómicas				Rearreglos cromosómicos	Fragmentación múltiple
	G	RC	RIC	Fragmentos		
Control	2	2	1	—	—	—
DMSO	5	4	3	5	—	—
1-8 AQ (5 μg/ml)	7	6	2	3	—	—
1-8 AQ (10 μg/ml)	22	65	10	47	2	12
1-8 AQ (30 μg/ml)	36	100	22	36	3	3

AQ: Dihidroxiantraquinona; DMSO: Dimetilsulfóxido; G: Gap; RC: Rotura cromátide; RIC: Rotura isocromátide.

mismo de 1 %. Tanto las soluciones de la 1-8Dihidroxiantraquinona como del Dimetilsulfóxido, permanecieron en contacto con el cultivo de linfocitos, durante las últimas 24 horas del período de incubación. La incubación se realizó durante 72 horas a 37° C; dos horas antes de cumplido este plazo fue agregado Colcemid en una concentración de 1.10^{-6} g/ml.

En la cosecha fue utilizada como solución hipotónica, una solución de ClK 0.075 M durante 12 min a 37° C, y como fijador metanol-ácido acético (3 : 1), efectuándose tres lavados sucesivos con el mismo antes de hacer extendidos. Las preparaciones así obtenidas se colorearon con Giemsa al 10 % en buffer de fosfatos de pH : 6.8.

Se analizaron 50 metafases directamente al microscopio usando objetivo de inmersión 100 ×. Se reiteró el análisis en ampliaciones fotográficas de metafases dudosas. Para la clasificación de los distintos tipos de alteraciones se siguió el criterio propuesto por Nakamura, K et al [8].

Resultados

En la Tabla 1 figuran las distintas aberraciones cromosómicas producidas por la 1-8 AQ, el Dimetilsulfóxido y el control. Se evidencia mayor número de aberraciones tipo cromátide (gaps, rotura cromátide) con respecto a las aberraciones tipo cromosómicas (rotura isocromátide, fragmentos). Al mismo tiempo se observa la aparición de rearreglos cromosómicos para las concentraciones de 10 y 30 μg/ml (Fig. 1).

La fragmentación múltiple es considerada como una sola rotura, ya que el elevado número de las mismas hace imposible la factibilidad de su conteo.

En la Tabla 2 se presentan los porcentajes de células afectadas para las tres concentraciones de la 1-8 AQ, siendo éstos comparados con el solvente, DMSO y el control. El análisis estadístico revela diferencias altamente significativas para el control con respecto a los cultivos tratados ($p < 10^{-12}$). No se detectan diferencias significativas entre los valores del solvente y la más baja concentración de 1-8 AQ (5 μg/ml), así como tampoco para las concentraciones de 10 y 30 μg/ml de 1-8 AQ entre sí. Cuando se comparan los valores del solvente y la concentración de 5 μg/ml de 1-8 AQ, con respecto a los obtenidos para las concentraciones de 10 y 30 μg/ml, respectivamente, se observa que las diferencias son altamente significativas ($p < 10^{-18}$).

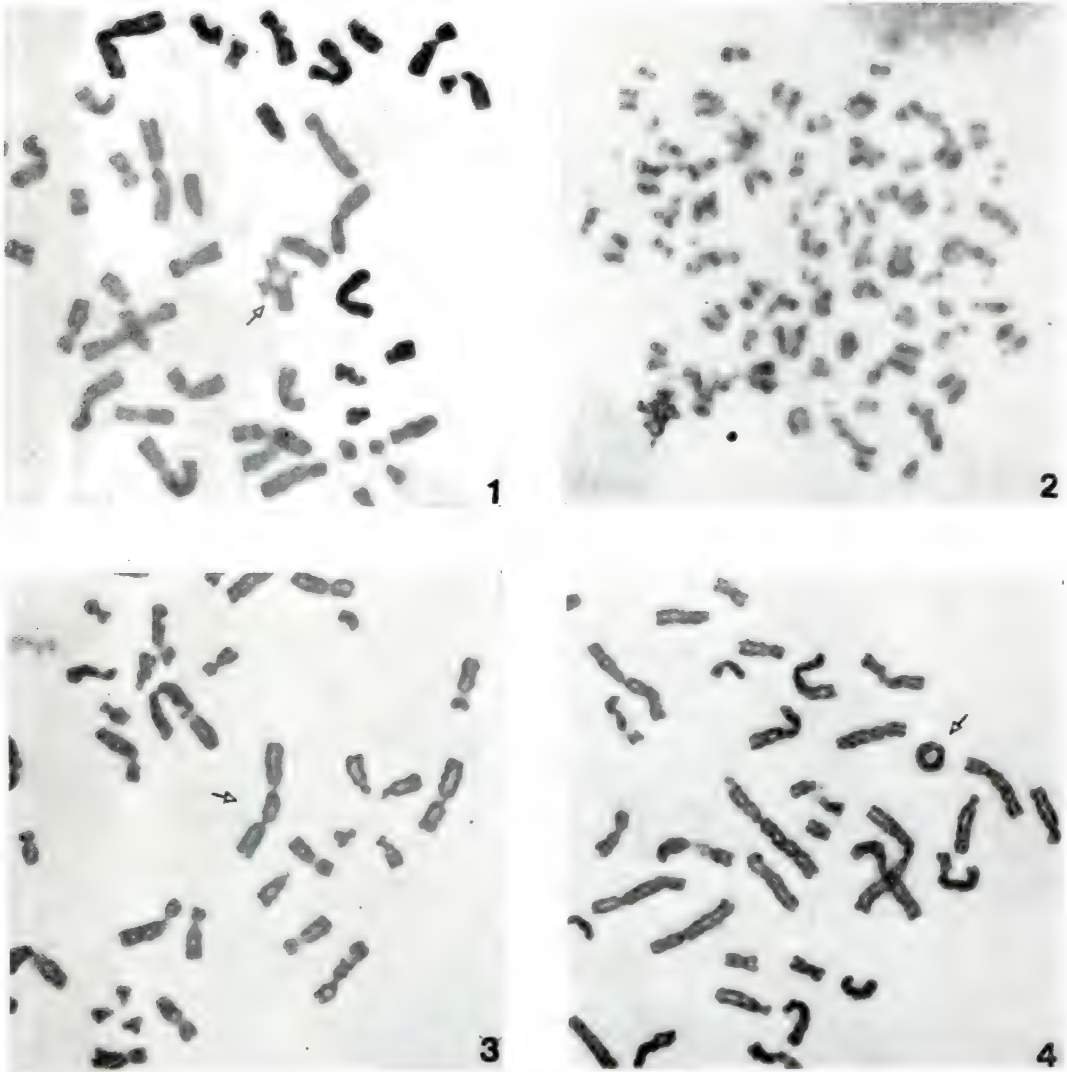
TABLA 2. — *Proporción de células dañadas con 1-8 AQ, DMSO y su comparación con el control*

Compuesto	Nº células analizadas	Nº células dañadas	% células afectadas
Control	50	5	10
DMSO	50	17	34
1-8 AQ (5 μg/ml)	50	18	36
1-8 AQ (10 μg/ml)	50	47	94
1-8 AQ (30 μg/ml)	50	49	98

AQ: Dihidroxiantraquinona; DMSO: Dimetilsulfóxido; AQ 5: Dihidroxiantraquinona 5 μg/ml; AQ 10: Dihidroxiantraquinona 10 μg/ml; AQ 30; Dihidroxiantraquinona 30 μg/ml.

Discusión

El número de alteraciones por célula, así como el porcentaje de células afectadas para la concentración de 5 μg/ml de 1-8 AQ, con respecto a los valores obtenidos en el control, evidencia un daño importante al material genético, siendo éste similar al producido por el Dimetilsulfóxido. La acción clastogénica es cate-



Figs. 1-4. — **1**, cuadrirradial; **2**, fragmentación múltiple; **3**, dicéntrico; **4**, anillo.

górica, cuando son comparados los valores para las concentraciones de 10 y 30 μg/ml de 1-8 Dihidroxiantraquinona, las que se hallan dentro de los valores terapéuticos, con el solvente (Dimetilsulfóxido) y el control. La ausencia de una respuesta mayor a la dosis de 30 μg/ml de 1-8 AQ con respecto a la de 10 μg/ml, podría deberse a la eliminación de células severamente dañadas de la población celular, o haber llegado a la concentración de saturación [7].

Los daños cromosómicos que pueden ser distinguidos citológicamente en metafase, pueden ser divididos en dos grupos: tipo cromosómico y tipo cromátide. El primero se produce cuando los linfocitos son expuestos a la acción de clastógenos durante el período G1 o S temprano del ciclo celular, mientras que si la exposición ocurre en S tardío o en G2 temprano, o durante G2, se evidencia el segundo tipo de daño [5]. El mayor número de aberraciones tipo cromátide detectadas en el presente trabajo, pueden deberse, a que el daño cromosómico es inducido en mayor proporción en G2 que en otros períodos precoces del ciclo celular, lo cual estaría de

acuerdo con datos recogidos de la literatura. Al mismo tiempo, resulta lógico pensar que las concentraciones de 10 μg/ml y 30 μg/ml de 1-8 Dihidroxiantraquinona inducen rearreglos cromosómicos, lo cual implicaría una considerable inducción de mecanismos de rotura y reunión. El hallazgo de las alteraciones inducidas por el solvente es de particular interés, no sólo por la posible acción citotóxica del mismo, sino por la utilización de solventes catalogados como de alta calidad sin haber sido previamente controlados, o por su efecto sinergizante con la 1-8 Dihidroxiantraquinona, aspectos que requieren de otros estudios para ser dilucidados.

Resumen

Algunos autores han señalado una acción mutagénica para los compuestos antraquinónicos en sistemas microbianos, ya sea en forma directa o por activación metabólica por sistema microsomal. Los compuestos mencionados tienen una amplia difusión como colorantes alimenticios, cosméticos, fármacos y laxantes. En el presente trabajo se realizó un estudio in vitro del efecto clastogénico de un derivado antraquinónico sintético, la 1-8 Dihidroxiantraquinona y el solvente en el que se solubiliza la droga, el Dimetilsulfóxido, en cultivo de linfocitos de sangre periférica humanos. Los resultados obtenidos permiten concluir que la droga ensayada presenta acción clastogénica en el sistema de ensayo aquí utilizado.

Summary

MUTAGENIC EFFECT OF AN ANTHRAQUINONE COMPOUND ON HUMAN LYMPHOCYTES.

A mutagenic action has been reported for anthraquinone compounds in bacterial systems, in a direct way or by metabolic action using the microsomal system. These compounds are widely disseminated as food coloring, cosmetics, pharmacology elements and laxatives. This experiment was carried out in vitro studying the clastogenic effect of a synthetic anthraquinone derivative, the 1-8 Dihydroxyanthraquinone, and its solvent, Dimetylsulfoxide, in human peripheral blood lymphocyte cultures. The results obtained indicate that this drug presents a clastogenic action in the assay system used.

Agradecimientos: Los autores expresan su reconocimiento al Dr. Tetsuji Matayoshi por su invalorable asesoría en la confección del presente trabajo, y a la Sra. Susana Paz, por su asistencia secretarial.

Bibliografía

1. Arakaki DT, Sparkes RS: Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics* 32: 57, 1963.
2. Brown JP, Brown RJ: Mutagenecity of Anthraquinone derivatives and related compounds: In vitro test with the *Salmonella typhimurium*. Microsomal system. 7th Annual Meeting Environmental Mutagen Society. Atlanta, Georgia, 1976.
3. Brown JP, Dietrich PS: Mutagenecity of anthraquinone and benzanthrone derivatives in the *Salmonella*. Microsome test: Activation of anthraquinone glycosides by enzymic extracts of rat cecal bacteria. *Mutation Research* 66: 9, 1979.
4. Dawson DJ, Otteson KM, Wang PC, Wingard RE (Jr): Soluble functional polymers, 2. Utilization of water insoluble cromophores in water soluble polymeric dies. *Macromolecules* 11: 320, 1978.
5. Evans HJ, O'Riordan ML: Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test. *Mutation Research* 31: 135, 1975.
6. Ippen H: Der stoffwechsel des 1.8-Dioxyanthrachinons. *Planta Med* 7: 423, 1959.
7. Kato H: Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair. *Experimental Cell Research* 85: 239, 1974.
8. Nakamuro K, Yoshikawa K, Sayato Y, Kurata H: Comparative studies of chromosomal aberration and mutagenecity of trivalent and hexavalent chromium. *Mutation Research* 58: 175, 1978.
9. Schmid W: Zum Wirkungsmechanismus diatetischer und medikamentoser Darmmittel. *Arzneimittel Forsch* 2: 6, 1952.
10. van Os FHL: Some aspects of the pharmacology of anthraquinone drugs. *Pharmacology* 14 (Suppl 1): 18, 1976.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 535-542 (1981)

ENDOCARDITIS INFECCIOSA TRICUSPIDEA

ESTUDIO CLINICO Y ECOCARDIOGRAFICO

A. F. TORINO, A. BALLESTER, J. A. MARTINEZ MARTINEZ, L. D. SUAREZ, A. M. A. PEROSIO

Sección Cardiología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires

En concordancia con los datos referidos por otros estudios [13] ha resultado significativa la alta incidencia de endocarditis infecciosa (EI) sobre la válvula tricúspide (VT) comprobada al efectuar una investigación retrospectiva de los pacientes internados en los últimos años en el Hospital de Clínicas con el diagnóstico presuntivo de la primera y estudiados con ecocardiografía en nuestro laboratorio. Dado que tal localización de la EI produce un cuadro de sepsis prolongada con neumopatías recurrentes que rara vez se acompaña de la signología propia del compromiso valvular, resulta difícil efectuar un diagnóstico de certeza [10]. La ecocardiografía, tanto en su modo M como la técnica bidimensional, ha surgido como el medio más apto para lograrlo, en base a la demostración in vivo de las vegetaciones sobre la VT [9-11]. El propósito de este trabajo es doble. En primer lugar relatar las principales características de los pacientes con EI sobre la VT comprobados en la mencionada investigación. En segundo término, puntualizar los hallazgos ecocardiográficos observados, que siempre resultaron decisivos para certificar el diagnóstico.

— — — —

Recibido: 10-VI-1981. Aceptado: 15-VII-1981.

Dirección postal: Sección Cardiología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Córdoba 2351, 1120 Buenos Aires, Argentina.

Material y métodos

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes con el diagnóstico de EI internados en el Hospital de Clínicas durante el período enero de 1978-abril de 1981. De ellos sólo se consideraron aquellos que cumplían los criterios establecidos por la Asociación de Cardiología de Nueva York [5] que son: 1º hemocultivo positivo asociado a un soplo cardíaco nuevo o cambiante y/o episodios embólicos, y 2º valvulopatía previa, o cardiopatía congénita, o soplo cardíaco nuevo o cambiante, asociado a una o más de las siguientes alteraciones: *a)* episodio embólico; *b)* fiebre; *c)* anemia, y *d)* esplenomegalia. Sobre su base se seleccionaron 53 pacientes por tener, además, ecocardiogramas técnicamente satisfactorios y haber sido vigilados durante su internación al menos por uno de los autores. Siete de ellos presentaron evidencias clínicas de EI sobre VT, confirmadas en tres por el examen anatomopatológico, y constituyen la población analizada en este estudio.

El examen ecocardiográfico fue realizado con la técnica habitual de nuestro laboratorio [21]. Para el modo M se utilizó un ecocardiógrafo Berger y/o un equipo Eko 20 A (SKI) con transductores de 2.25 y 3.5 Mega Hertz focalizados a 7.5 cm. Los registros se efectuaron sobre papel fotosensible a una velocidad de 25-50 mm/seg. Los ecocardiogramas bidimensionales fueron realizados con un aparato Eko Sector I (SKI) provisto de transductores en tiempo real con ángulos de 30 y 86 grados. Sus registros fueron grabados en video tape con un equipo Sanyo VTR y mediante el procedimiento denominado de "imagen congelada" se obtuvieron fotografías con sistema polaroid o con cámara de 35 mm. Para tal técnica se utilizaron los siguientes cortes ultrasónicos: 1º eje mayor para el ventrículo izquierdo; 2º ejes menores para el ventrículo izquierdo a nivel de la

válvula aórtica, de la válvula mitral y de la implantación de los músculos papilares, y 3º cuatro cavidades desde la punta. En cada paciente se efectuaron varios exámenes tanto durante el período infeccioso como *a posteriori* del mismo. Las vegetaciones fueron diagnosticadas en modo M ante la presencia de múltiples ecos irregulares sobre la VT sin limitación de su movilidad y en el modo bidimensional sobre la base de masas de tamaño variable, sésiles o pediculadas, por lo general de apariencia amorfa y con igual localización [7, 8].

El diagnóstico clínico de sepsis se formuló por la existencia de un síndrome febril prolongado, focos sépticos metastásicos, hemocultivo positivo y manifestaciones reaccionales sistemáticas, con o sin identificación de la puerta de entrada del germen en juego.

El tromboembolismo pulmonar fue diagnosticado en presencia de cuadro clínico típico y hallazgos significativos en la radiografía de tórax, centellograma pulmonar ventilación perfusión y estudio humoral [12].

Se consideró que existía una insuficiencia tricuspídea cuando se comprobó: 1º pulso venoso yugular regurgitante sistólico (ventricularizado o sistólico positivo): 2º pulso hepático sistólico con o sin expansión del órgano; 3º soplo pansistólico mesocardíaco acentuado durante la inspiración, y 4º sobrecarga de volumen del ventrículo derecho en el ecocardiograma [6, 14].

El examen bacteriológico fue realizado por la Sección especializada del Departamento de Análisis Clínicos del Hospital. El examen necrópsico fue llevado a cabo en los tres pacientes fallecidos de acuerdo con la técnica habitual de 1ª y 2ª Cátedra de Anatomía Patológica de la Universidad de Buenos Aires.

Resultados

La localización tricuspídea representó el 13 % del total de pacientes seleccionados con EI (7/53), perteneciendo cuatro al sexo masculino y tres al femenino, con una edad promedio de 29 ± 13 años. El lapso transcurrido entre el comienzo de los síntomas y el diagnóstico fue de 50 ± 26 días. La puerta de entrada pudo identificarse en cinco, correspondiendo a infección venosa en tres pacientes, a un aborto séptico en otro y a una dermatitis supurada en el restante. Se comprobaron factores predisponentes en cuatro. En tres pacientes se trató de diabetes mellitus y en el restante de alcoholismo crónico. Sólo en dos pacientes pudo documentarse una cardiopatía previa al injerto bacteriano, tratándose de una tetralogía de Fallot operada 18 años antes y de una comunicación interventricular. El estafilococo *aureus* fue el responsable en cinco de los siete casos, mientras que en el resto se aisló un estreptococo *viridans* y un estreptococo grupo C.

En todos los pacientes el cuadro clínico estaba constituido por una sepsis generalizada con tromboembolismo pulmonar séptico recurrente. Sólo en uno estaban presentes los signos de la insuficiencia tricuspídea.

Con ecocardiografía en modo M se reconocieron vegetaciones en seis casos (Figs. 1, 2, 3 y 4), las que fueron confirmadas por el método bidimensional en cuatro pacientes. Uno de éstos presentó compromiso simultáneo de las dos válvulas izquierdas. Se comprobó, además, por

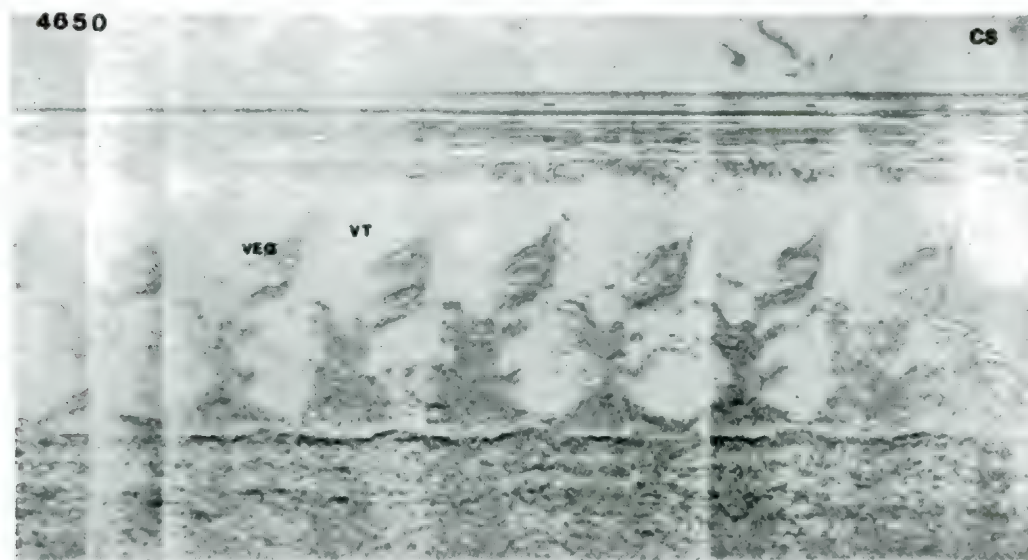


Fig. 1. — Nivel tricuspídeo de la paciente C.S., registrado a 50 mm por segundo; en él se aprecian las vegetaciones (VEG) como una imagen densa "en musgo" adheridas a la válvula tricúspide (VT).

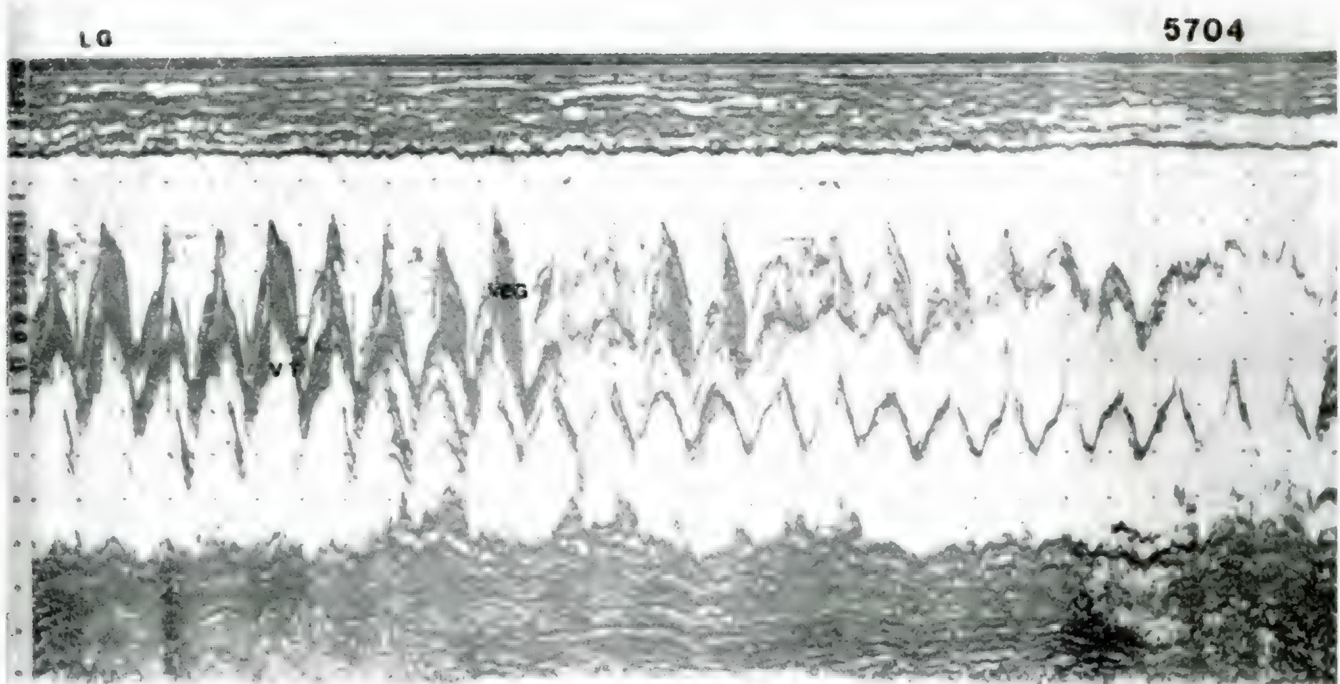


Fig. 2. — Vegetaciones sobre válvula tricúspide, de gran tamaño, que adopta una morfología seudotumoral. Válvula mitral indemne (Cuadrante inferoderecho). VEG: vegetaciones; VT: válvula tricúspide.

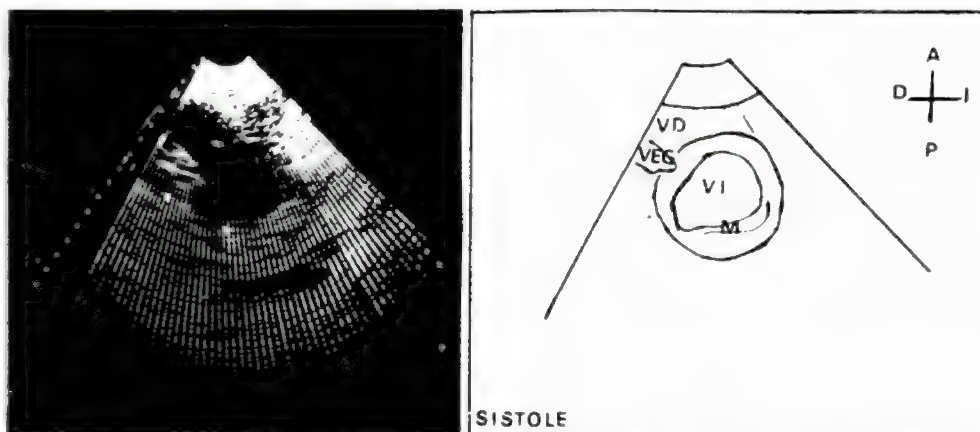


Fig. 3. — Ecocardiograma bidimensional de 86º en el eje menor para el ventrículo izquierdo a nivel de la válvula mitral en sístole y su esquema. Se observa la cavidad ventricular izquierda (VI) con la válvula mitral (M) cerrada. En la parte superior y a la derecha la cavidad ventricular derecha (VD), con una voluminosa masa densa producida por las vegetaciones adheridas a la válvula tricúspide (VEG). A: anterior; P: posterior; I: izquierda. D: derecha.

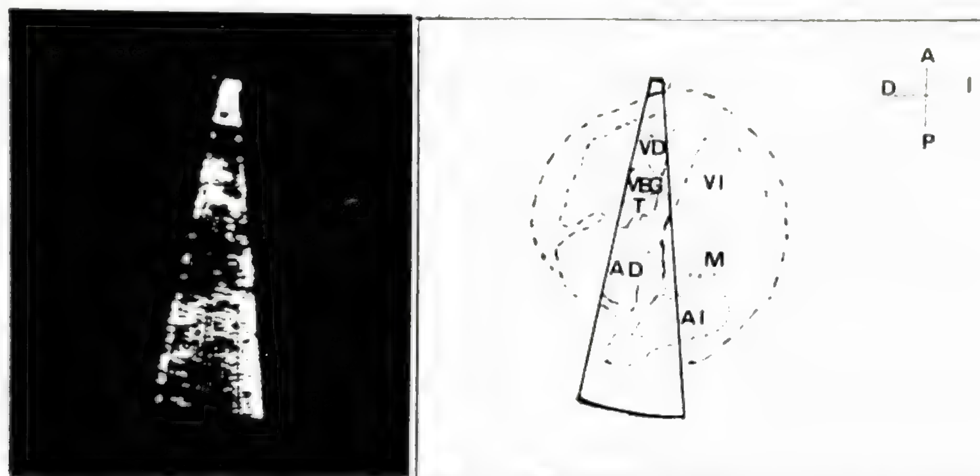


Fig. 4. — Ecocardiograma bidimensional de 30º de 4 cavidades desde la punta y su esquema. Se observa por delante la cavidad ventricular derecha (VD). La valva septal de la tricúspide (T) con una voluminosa vegetación (VEG) adherida y por detrás la aurícula derecha (AD). En el esquema, VI: ventrículo izquierdo; M: válvula mitral; AI: aurícula izquierda; A: anterior; P: posterior; I: izquierda; D: derecha.

TABLA 1. — *Endocarditis infecciosa sobre válvula tricúspide.*

Caso	Edad y sexo	Cardiopatía previa	Factores predisponentes	Embolias	Vegetaciones		Autopsia		
					Modo-M	2D*	Vegetaciones	Microabscesos en miocardio	Pericarditis
1	25 F	No	Diabetes	Pulmón	Sí	—	—	—	—
2	21 M	No	Alcoholismo	Pulmón	Sí	Sí	—	—	—
3	28 F	Fallot	No	Pulmón	Sí	Sí	—	—	—
4	17 M	C.I.V.	No	Pulmón	Sí	Sí	—	—	—
5	23 M	No	Diabetes	Pulmón	Sí	Sí	Sí	Sí	Fibrinosa adhesiva
6	31 F	No	No	Pulmón	Sí	—	Sí	Sí	Exudativa
7	58 F	No	Diabetes	Pulmón	—	—	Sí	Sí	Fibrinosa adhesiva

* 2D: Bidimensional.

ambos métodos, un derrame pericárdico mediano en tres pacientes.

En el único paciente con signos de insuficiencia tricuspídea se efectuó estudio hemodinámico que corroboró la regurgitación valvular, a la vez que demostró una franca disminución de la contractibilidad ventricular, que hizo desaconsejar el tratamiento quirúrgico inmediato.

El tratamiento médico logró la curación del proceso séptico en cuatro pacientes, incluyendo el caso con disfunción tricuspídea. En éste se obtuvo, además, una ostensible mejoría de la mala función miocárdica, pero abandonó el hospital al plantearse la intervención quirúrgica.

Tres pacientes fallecieron a consecuencia de un cuadro séptico con tromboembolismo pulmonar recurrente incontrolable (Tabla 1). Se efectuó necropsia en los tres, comprobándose vegetaciones sobre la VT en todos, incluso en el único que la ecocardiografía no las había detectado (Fig. 5). Uno de ellos presentó, además, ruptura de la VT, pero la misma se había producido con posterioridad al examen ecocardiográfico. En los tres se encontraron infartos sépticos pulmonares, excavado en uno de ellos. También existía en todos una miocarditis séptica caracterizada por dilatación cardíaca y múltiples microabscesos, así como una pericarditis fibrinosa adhesiva.

Fig. 5. — Corte longitudinal del tracto de entrada del ventrículo derecho que expone la válvula tricúspide donde se observan vegetaciones endocárdicas de distinto tamaño.

Discusión

El compromiso de la VT en el grupo de pacientes con EI de este estudio mostró una frecuencia de presentación (13 %) semejante a la establecida por otros autores en fechas posteriores a 1970 [9, 13, 16] y contrasta con la referida décadas atrás [3].

Es, asimismo, concordante con la comprobada en otros centros [13] la incidencia de la forma multivalvular representada por un paciente de esta serie.

Del análisis de sus principales características surge que la EI sobre VT presenta perfiles propios tanto de sus factores etiopatogénicos como de su cuadro clínico. Lo mismo cabe decir de las reglas que deben guiar su tratamiento. En cuanto a los primeros, debe recalcarse que se trata de pacientes más jóvenes que los que integran el resto de las EI [15, 16]. Muchos, como ocurrió en cuatro de los casos de esta serie, tienen antecedentes de diabetes o alcoholismo sin cirrosis, que pueden ser considerados factores predisponentes por inmunodepresión [16]. El germen predominante en los pacientes de este estudio resultó, como en los referidos por otros [17, 22], el estafilococo dorado, ya que se lo comprobó en cinco de los casos. Ello está de acuerdo con la puerta de entrada de la infección, representada en esta serie por punciones y canalizaciones venosas, infecciones cutáneas, y endocarditis séptica secundaria o maniobras abortivas. Sin embargo, a diferencia de lo comprobado en otros países [10], no pudo documentarse ningún caso atribuible a drogadicción, lo que constituyó un hallazgo alentador [18]. En cuanto a la presencia de cardiopatías previas al injerto bacteriano sólo pudo demostrársela en dos pacientes, pero dado el tipo comprobado en ambas, casi con seguridad no era acompañado por daño estructural previo de la válvula tricúspide. Ello significaría que en todos los casos se trató de injerto bacteriano sobre válvula sana, lo que concuerda con lo referido por otros autores [1], y contrasta con lo conocido sobre los EI de válvulas cardíacas izquierdas [4]. Tales hallazgos son explicables sobre la base de la gran agresividad del germen predominante en este tipo de EI, representado por el estafilococo dorado, y la mayor susceptibilidad del huésped por la alta incidencia de diversas formas de inmunosupresión. Cabe agregar que estos dos últimos factores, en unión con la enorme difusión de diversas formas y con diferentes fines de la vía venosa en las dos últimas décadas, son los responsables del notable incremento de las EI sobre VT.

En relación al cuadro clínico, debe recalcarse la forma larvada de presentación de la enfermedad. Todos los pacientes de este estudio mostraron el cuadro de una sepsis grave acompañada de tromboembolismo pulmonar séptico recurrente, no rara vez como neumonías a repetición. El compromiso cardíaco resultó evidente sólo en un caso, bajo la forma de insuficiencia tricuspídea grave. Esto coincide con lo referido por otros autores [17] y explica el notable retraso observado tanto en la internación del paciente como en la solicitud de la consulta cardiológica una vez producida la misma. Debe puntualizarse que esta última se llevó a cabo en esta serie después de un promedio de 27 días a partir de la internación.

El estudio ecocardiográfico mostró alta sensibilidad para la identificación de las vegetaciones sobre la VT ya que lo logró en seis de los pacientes, dos de los cuales tuvieron confirmación en el examen anatomopatológico. Es importante recalcar que el modo bidimensional es de notable utilidad para la individualización de vegetaciones sobre la VT (Figs. 3 y 4). Además, permite observar con nitidez las groseras deformaciones provocadas en ella por la EI, así como las potenciales complicaciones evolutivas, tales como la ruptura cordal y el prolapso valvar en la aurícula derecha. A ello debe agregarse que cuando se produce un intenso reflujo tricuspídeo es dable visualizar la dilatación de la vena cava inferior. Por otra parte, tanto la técnica bidimensional como el modo M brindaron información adicional sobre la función ventricular a base del diámetro de la cavidad ventricular y la forma de contracción de sus paredes. Ello es de fundamental trascendencia para decidir el momento más oportuno de la intervención quirúrgica tal como ocurrió en esta serie. Con similares parámetros es posible, asimismo, valorar con mayor exactitud el pronóstico alejado una vez obtenida la curación del proceso séptico. Tampoco debe olvidarse que ambas técnicas ecocardiográficas representan el medio más eficaz para el diagnóstico del derrame pericárdico [18, 20], complicación frecuente

de esta forma de EI, hecho corroborado por los hallazgos de este estudio.

Merece también comentario la muy alta tasa de mortalidad de la EI sobre VT. Su cifra (3/7) resulta aun superior a la de otra variedad particularmente grave de esta afección, denominada EI sobre válvula aórtica con masas prolapsantes en el tracto de salida del ventrículo izquierdo [21] y se acerca a la observada en otras series para las formas multivalvulares [13]. Varios factores contribuyen a determinarla, pero los principales son: 1º gran frecuencia y especial virulencia del estafilococo *aureus* entre los agentes causales; 2º coexistencia de entidades depresoras de la inmunidad, y 3º cuadro clínico larvado con escasas o nulas manifestaciones sobre el origen cardíaco del proceso, con la consiguiente demora en el diagnóstico correcto. La combinación de los mismos permite explicar, asimismo, la difusión y gravedad de las lesiones encontradas en la anatomía patológica, de las que sobresale la miocarditis séptica. La misma contribuye a la terminación fatal del proceso infeccioso a la vez que es factor básico en el deterioro hemodinámico.

De lo expuesto surge con claridad que la ecocardiografía resultó el método de examen más útil y con el que se logró la correcta filiación del proceso. Si bien es cierto que la detección de vegetaciones valvulares no permite concluir sobre la presencia de actividad de la EI, debido a que suelen ser comprobadas mucho tiempo después de obtenida su curación clínica [19], es indudable que su demostración en un paciente en plena sepsis, con tromboembolismo pulmonar séptico recurrente, decide siempre el diagnóstico. De allí, la necesidad de insistir sobre el examen ecocardiográfico, método eficaz, incruento y reproducible, en todo paciente con cuadro semejante al descripto e incluso frente al simple diagnóstico de "síndrome febril prolongado". Un reconocimiento temprano a base de esta técnica, con el consiguiente tratamiento inmediato, parece la forma actual más eficaz para mejorar el grave pronóstico de esta variedad de EI.

En conclusión, el injerto bacteriano de la VT es en la actualidad una localización frecuente de la EI, lo que contrasta con lo observado dos décadas atrás; predomina en sujetos jóvenes con frecuentes factores de inmunodepresión, en especial diabetes, y el estafilococo aparece como el germen predominante; su cuadro clínico es larvado, sobresaliendo la escasa incidencia de manifestaciones cardíacas; casi siempre el reconocimiento de la afección es tardío; la ecocardiografía aparece como el método actual más eficaz para lograr el diagnóstico; la mortalidad de la localización sobre VT es una de las más elevadas observadas en la EI debido sobre todo al retraso en el diagnóstico, y es muy probable que la ecocardiografía pueda mejorar su mal pronóstico en base a un reconocimiento temprano.

Resumen

Se presentan los hallazgos clínicos y ecocardiográficos de siete pacientes (cuatro hombres, tres mujeres) con endocarditis infecciosa sobre la válvula tricúspide, en tres de los cuales se efectuó necropsia. Su incidencia en un grupo de 53 pacientes con endocarditis infecciosa fue del 13 % (7/53). La edad promedio fue de 29 ± 13 años, la puerta de entrada de la infección se documentó en cinco de los siete, el estafilococo aereus *fue el germen predominante en igual proporción (5/7), se comprobó un alto porcentaje (4/7) de factores predisponentes (diabetes, alcoholismo) y cardiopatías previas en dos pacientes (tetralogía de Fallot, comunicación interventricular). El lapso transcurrido entre el comienzo de la enfermedad y el diagnóstico fue de 50 ± 26 días. El cuadro clínico resultó el de una sepsis grave con tromboembolismo pulmonar séptico recurrente. Sólo en un paciente existían signos de disfunción de válvula tricúspide. La ecocardiografía (modo M y bidimensional) demostró vegetaciones en seis casos. Fallecieron tres de los siete pacientes. La necropsia mostró vegetaciones en los tres, incluso en el que la ecocardiografía no las había detectado. Demostró, además, una miocarditis séptica (múltiples microabscesos) y una pericarditis en los tres pacientes. La alta tasa de mortalidad parece derivar de la gran virulencia de los gérmenes en juego,*

la presencia de factores predisponentes, la forma larvada del cuadro clínico y el consiguiente retraso en el diagnóstico. La ecocardiografía, resulta el método actual más útil para el reconocimiento temprano de la afección. Es muy probable que su difusión modifique el grave pronóstico.

Summary

TRICUSPID INFECTIVE ENDOCARDITIS. CLINICAL AND ECHOCARDIOGRAPHIC STUDY.

The incidence of tricuspid endocarditis (TE) during recent years is three or four times higher than the data reported before 1950 [3]*. Drug addiction and expansive diagnostic and therapeutic use of the venous catheterization have been considered as the main causes of this increasing number* [10, 13]*. We report the clinical study of seven patients with TE with special emphasis on their echocardiographic findings. They were collected from a group of 53 patients with infective endocarditis studied at the Hospital de Clínicas of Buenos Aires from January 1978 to April 1981 (incidence 13 %). Four patients were male and three were female with a mean age of 29 ± 13 years. The source of infection could be documented in five patients; staphylococcus* aureus *was the predominant agent isolated (5/7); predisposing factors (diabetes mellitus, alcoholism without hepatic cirrhosis) were present in four cases and a preexisting heart disease (tetralogy of Fallot, ventricular septal defect) was demonstrated in two. The lapse of time between the onset of symptoms and the clinical diagnosis was a mean of 50 ± 26 days. The clinical spectrum was a sepsis with recurrent pulmonary septic thromboembolic episodes. Only one patient showed signs of tricuspid dysfunction. Echocardiography (M-mode and sector scanning) demonstrated valvar vegetations in six cases. Three patients died. Necropsy showed tricuspid valvar vegetations in all patients including one case with no vegetations detected by echocardiography. Microscopic examination revealed a septic myocarditis and fibrinous pericarditis in all patients (Table 1). The high mortality rate could be attributed to the staphylococcus* aureus *virulence, to the presence of predisposing factors and to the masquerading clinical course with the subsequent delay in diagnosis. Echocardiography is the most useful diagnostic test for the early detection of this entity and it can be assumed that it will improve the present poor prognosis of the disease.*

Bibliografía

1. Andy JJ, Sheikh MU, Ali N, Barnes BO, Fox LM, Curry ChL, Roberts WC: Echocardiographic observations in opiate addicts with active infective endocarditis. *Am J Cardiol* 40: 17, 1977.
2. Baks T, Fletcher R, Nayab A: Infective endocarditis. A study of forty-five necropsy patients. *Am J Med* 53: 20, 1972.
3. Berreta JA, Mosso H: Endocarditis bacteriana subaguda. Fisiopatología, clínica y tratamiento. Buenos Aires, Ed. Universitaria, 1957.
4. Buchbinder NA, Roberts WC: Left-sided valvular active infective endocarditis. A study of forty-five necropsy patients. *Am J Med* 53: 20, 1972.
5. Criteria Committee of The New York Heart Association: Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels. Boston, Little, Brown, Co., 1979.
6. Cuesta Silva M, Boskis PF, Lerman J, Binello MM, Torino A, Scattini M, Boskis B, Perosio AMA: Ecocardiografía clínica. Buenos Aires. El Ateneo, 1977.
7. Dillon JC, Feigenbaum H, Konecke L, Davis RH, Chang S: Echocardiographic manifestations of valvular vegetations. *Am Heart J* 86: 698, 1973.
8. Gilbert B, Haney RN, Crawford F, Mc Clellan J, Gallis H, Johnson M, Kisslo J: Two dimensional echocardiographic assessment of vegetative endocarditis. *Circulation* 55: 346, 1977.
9. Kisslo J, Rown OT, Hanney R, Jones R, Juk S, Behar US: Echocardiographic evaluation of tricuspid valve endocarditis. *Am J Cardiol* 38: 502, 1976.
10. Lange M, Salaki JS, Middleton JR, Sen P, Kapila R, Gocke M, Louria DB: Infective endocarditis in heroin addicts. Epidemiological observations and some unusual cases. *Am Heart J* 96: 144, 1978.
11. Lee ChCh, Ganguly SN, Magnisalis K, Robin E: Detection of tricuspid valve vegetations by echocardiography. *Chest* 66: 432, 1974.
12. Mordeglia F, Gandulla LM, O'Flaherty E, Bertorelli M, Gil M: Tromboembolismo pulmonar agudo. Estudio de 140 casos con com-

probación necrópsica. *Medicina (Bs Aires)* 37 (Supl Nº 2): 112, 1977.
13. Pelletier LL, Petersdorf RG: Infective endocarditis: A review of 125 cases from the university of Washington Hospitals 1963-1972. *Medicine* 56: 287, 1977.
14. Perosio A: La semiología de las lesiones tricuspídeas. *Pr Méd Argent* 45: 3810, 1958.
15. Perosio A, Suárez LD, Sciandro E, Llera JJ: Endocarditis bacteriana en pacientes mayores de 55 años. *Semana Médica* 133: 1417, 1968.
16. Rahimtoola SH: Infective Endocarditis. New York, Grune and Stratton, 1978, p 127.
17. Reisberg BE: Infective endocarditis in the narcotic addicts. *Prog Cardiovasc Dis* 22: 193, 1979.
18. Stimmel B, Donoso E, Dack S: Comparison of infective endocarditis in drugs addicts and not drug users. *Am J Cardiol* 32: 924, 1973.
19. Stafford A, Wann SL, Dillon JC, Weyman AE, Feigenbaum H: Serial echocardiographic appearence of healing bacterial vegetations. *Am J Cardiol* 44: 754, 1979.
20. Torino AF, Martínez Martínez JA, Ballester A, Pittaluga E, Perosio AMA: Contribución de la ecocardiografía al estudio de la patología del pericardio en 52 enfermos. *Rev Argent Cardiol* 48: 237, 1981.
21. Torino A, Martínez Martínez JA, Ballester A, Suárez LD, Perosio AMA: Contribución de la ecocardiografía a la indicación quirúrgica de la endocarditis infecciosa. *Medicina (Bs Aires)* 41: 125, 1981.
22. Weinstein L, Rubin RH: Infective Endocarditis 1973. *Prog Cardiovasc Dis* 16: 239, 1973.

— — — —

That the single most dysgenic event in the history of mankind was departure from a pattern of polygamy based on leadership, ability and iniciative.

El hecho más disgénico en la historia de la humanidad fue el abandono de la poligamia que tenía por base el liderazgo, la capacidad e iniciativa.

E. Mayr

En: J. Eccles, *The Human Mystery*, 1978

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 543-548 (1981)

CHRONIC CHAGAS DISEASE IN THE MOUSE: III. ABSENCE OF CONCOMITANT IMMUNITY AFTER REPEATED INFECTIONS

PATRICIA CABEZA MECKERT *, R. P. LAGUENS

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Cátedra de Patología II, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

In spite of the generalized concept that already parasitized animals or humans are resistant to reinfection with the same parasite (concomitant immunity) [6], few studies exist concerning the effect of repeated inoculations on the evolution of experimental or human chronic Chagas disease. To our knowledge, no definitive evidence exists demonstrating concomitant immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. To establish or to rule out the existence of this special type of immunity should be of considerable interest, since the possibility should be considered that the natural history of Chagas disease in people living in endemic areas who are continuously exposed to reinfections is different from that of those who move to non endemic zones. In addition, it would also be of interest to find out if disinsectization campaigns, with a consequent decrease in the frequency of reinfections, could have some effect on the evolution of the disease in already infected individuals. In the present paper the effect of repeated infections with a low number of parasites on the evolution of chronic Chagas disease in the mouse is described.

— — — —

Received: 13-V-1981. Accepted: 10-VI-1981.

* Member of Technical Career, CIC (Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires).

Postal address: Cátedra de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina.

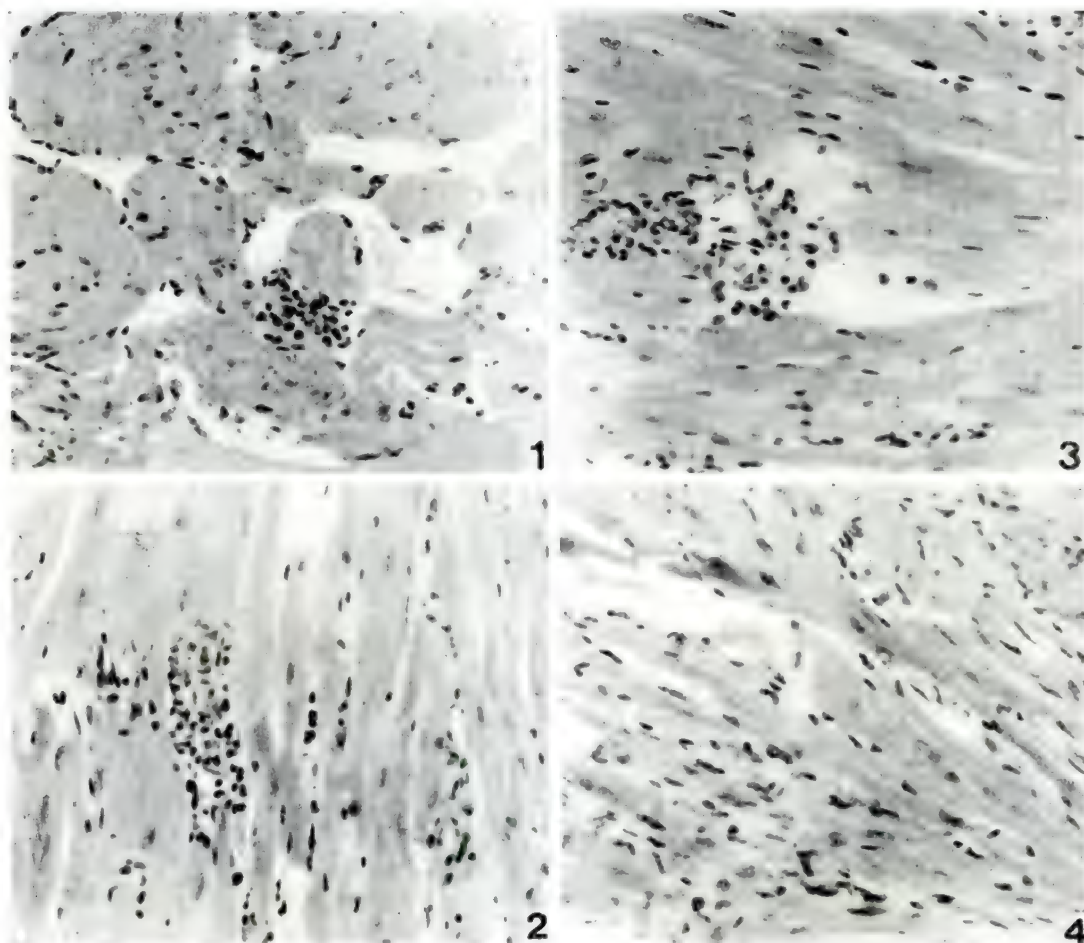
Material and methods

Experimental Design: A total of 55 outbred female Swiss albino mice, 3 months old, were inoculated intraperitoneally with 25 trypomastigotes of *T. cruzi*, Tulahuen strain. Details of infection and development of disease were previously described [15]. Of these, 28 mice were reinoculated in the same way at 38, 50 and 150 days after the first injection. Mortality and parasitemia were controlled weekly. The remaining 27 animals, which received a single inoculation of parasites, were kept and studied in the same conditions. Both groups were killed 60 days after the last reinfection. Samples of heart, skeletal muscle and colon were processed for semi-quantitative histological studies.

Histological studies: The organs were fixed in Bouin and embedded in paraffin. Semiserial sections were stained with hematoxylin-eosin. Single blind studies were performed, grading in an arbitrary scale from 0 to 4 according to the following parameters: *Heart:* 0: no lesions; 1: scarce mononuclear infiltrates located in the atria; 2: scarce (less than 1 per tissue section) nodular inflammatory infiltrates extending to atria and ventricles; 3: numerous mononuclear inflammatory infiltrates in the ventricles; 4: diffusse myocarditis and fibrosis.

Skeletal Muscle: 0: no lesions; 1: scarce and small intestitial inflammatory infiltrates; 2: large mononuclear infiltrates; 3: diffuse myositis and cell atrophy; 4: muscle fiber necrosis and replacement by adipose tissue. In the large bowel no quantification of lesions could be done and only presence of absence of inflammatory infiltrates in the muscular layer were recorded.

Results were analyzed with Student's t test. Representative lesions are illustrated in Figures 1 to 8.

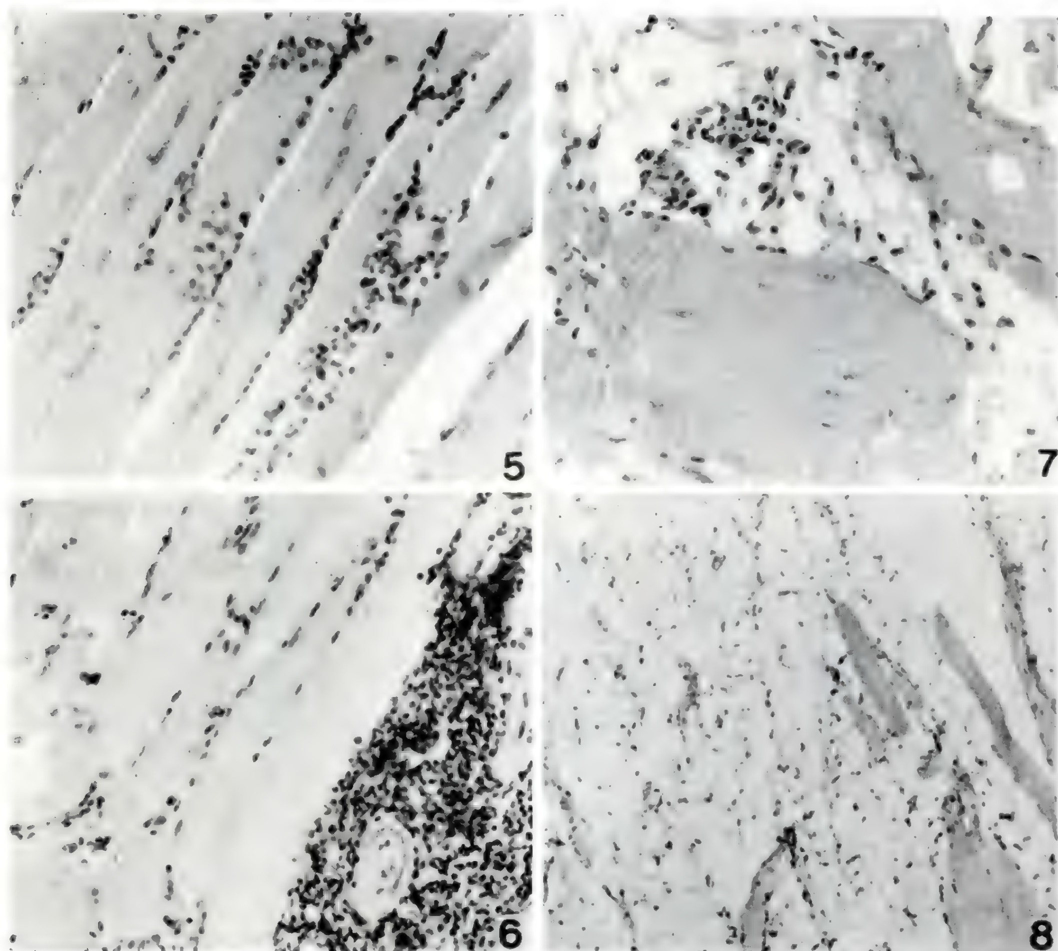


Figures 1-4. — Heart: **1**, Grade I. Small nodular lymphocytic infiltrates in the atrium. **2**, Grade II lesion. Small nodular infiltrate in the ventricular wall; **3**, Grade III lesion. Several inflammatory infiltrates in the interstitium of the ventricular wall; **4**, Grade IV lesion. Interstitial fibrosis.

Results

Parasitemia and mortality: All animals presented parasitemia during the first 30 days post-infection. In those which received a single inoculation parasitemia was negative after the first month post-infection and remained negative during the course of the experiment. On the contrary, in the reinfection group parasitemia, lasting between 1 and 2 weeks, reappeared after each inoculation. Mortality at the end of the experiment was 15 % in the group that received a single inoculation. Cumulative mortality attained 50 % in the reinfected animals.

Morphological Studies: Although the incidence of myocarditis and myositis was higher in the surviving reinfected mice, difference was slight and with no statistical significance. On the contrary, alterations of the large bowel were more frequent in the reinfected animals (47 %) as compared with the group with a single infection (17 %). Grading of lesions showed that in the heart the intensity of alterations was similar in the surviving animals of both groups, but in skeletal muscle the animals that received multiple inoculationes presented significantly more intense lesions. Results are summarized in Table 1.



Figures 5-8. — Skeletal muscle: **5**, Grade I lesion. Interstitial mononuclear infiltrates; **6**, Grade II lesion. Confluent perivascular and interstitial mononuclear infiltrates; **7**, Grade III lesion. Atrophy of fibers, replacement by adipose tissue and inflammatory infiltrates; **8**, Grade IV lesion. Advanced fiber atrophy and replacement by adipose tissue.

TABLE 1. — *Effect of multiple infections on mortality, incidence and intensity of lesions*

	Single infection	Multiples infections
Number of animals	27	28
Cumulative mortality	15 %	50 %
Incidence of lesions:		
Skeletal muscle	70 %	82 %
Heart	76 %	88 %
Large bowel	17 % **	47 % **
Intensity of lesions *:		
Skeletal muscle	1.41 ± 0.07 SE **	2.85 ± 0.08 SE **
Heart	1.52 ± 0.06 SE	1.32 ± 0.05 SE

* Grading was performed as described in Materials and methods.
** $p < 0.01$.

Discussion

It is generally held that already parasitized individuals are resistant to homologous parasitic reestablishment. The terms concomitant [6], or non sterilizing immunity [2] or premunition [7] have been coined to describe this situation. To our knowledge, few studies have been done to find out if in *T. cruzi* infection this phenomenon exists. Andrade et al [1] reported that mice infected with *T. cruzi* are highly resistant to new inoculations, with no increase of mortality or intensity of organic lesions. On the contrary, our results show that reinfection of the mouse with a low number of trypomastigotes induces a reappearance of parasitemia and increases significantly the mortality and the severity of lesions of skeletal muscle and large bowel. This discrepancy in results could be due to the different experimental conditions. Andrade et al [1] infected mice with a large number of parasites, a procedure that induces a high mortality. Since reinfections were performed on survivors of a severe and acute disease it is possible that animals were involuntarily selected and reinfections were performed on relatively resistant animals. This interpretation is supported by the observations of Kiersenbaum and Howard [4] who, using Biozzi mice, reported that animals with low immunological response were more susceptible to *T. cruzi*, in two strains with different tissue tropisms. In our experiments, infection with a low number of parasites induces a chronic disease with low mortality. Apparently the surviving animals do not show concomitant immunity, since parasitemia reappeared after each reinfection and lesions of intestine and skeletal muscle were more severe. These facts would indicate that in experiments on concomitant immunity special care must be taken with the parasite dose. The lack of a more severe heart disease in the surviving reinfected animals as compared with those that received a single dose of parasites was a surprising finding. This could indicate that in the pathogenesis of tissue damage different mechanisms operate for the heart as compared with skeletal muscle and intestine. In these two organs it is possible that parasites would exert a direct action. Reaggravation of infection secondary to reinoculation would lead to a more severe tissue damage. However, nests of amastigotes were scarcely seen in the numerous sections examined, and no quantitative difference in incidence was present between both experimental groups. Since in the heart, indirect mechanisms, mainly immunologic, have been postulated for the pathogenesis of alterations in chronic Chagas disease [3], it could be considered that reaggravation of infection would not alter the evolution of an already established immunologic disease. However, the possibility of selection of mice resistant to heart alteration cannot be discarded, since in the present experiment the cause of mortality was not established. The absence of increase of the intensity of the heart disease in the reinfected group is in agreement with the epidemiological observation of Silva [8] who reported that in the follow up of people in disinsectized areas no difference in the prevalence of heart disease was found as compared with people from areas highly infested with triatomid bugs and who were exposed to multiple reinfections.

From our results, it can be concluded that mice with chronic Chagas disease are not resistant to new infections with a low number of parasites, a procedure which, on the contrary, leads to reaggravation of parasitemia, higher mortality and to an increase in the severity of skeletal muscle and large bowel lesions.

Summary

In order to find out if mice with chronic Chagas disease are resistant to new infections (concomitant immunity), 28 female mice infected with 25 trypomastigotes of Tulahuen strain were reinfected with the same number of parasites at 38, 50 and 150 days after the first inoculation. As control, mice of matching age and sex received a single dose of 25 parasites. All animals were killed 220 days after the first inoculation. Samples from heart, skeletal muscle and large bowel were processed for semiquantitative his-

tological studies. During the course of the experiment mortality and parasitemia were recorded weekly. At the end of the experiment cumulative mortality was 15 % in the animals that received a single parasite dose and 50 % in the multiple infection group. In the mice infected only once, parasitemia was positive during the first 30 days postinfection while in the reinfected animals, parasitemia was positive during the first 2 weeks after each reinoculation. The incidence of the inflammatory lesions in the muscle layer of the large bowel was higher (47 %) in the reinfection group than in the single infection group (17 %). Although the incidence of myocarditis and myositis was similar for both groups myositis was significantly more intense in the reinfected animals. From these results it can be concluded that mice with chronic Chagas disease are not resistant to new infections, a procedure which leads to reappearance of parasitemia, an increase in mortality rate and a higher intensity of the large bowel and skeletal muscle lesions.

Resumen

ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA EN EL RATÓN: III. AUSENCIA DE INMUNIDAD CONCOMITANTE AL REPETIR LAS INFECCIONES.

Con el fin de demostrar si los ratones con enfermedad de Chagas crónica presentan resistencia a nuevas infecciones (inmunidad concomitante) 28 ratones hembras infectadas con 25 tripomastigotes de la cepa Tulahuen fueron reinfectados con el mismo número de parásitos 38, 50 y 150 días después de la primera inoculación. Como controles se emplearon 27 ratones de la misma edad y sexo que recibieron una única dosis de 25 parásitos. Todos los animales se sacrificaron a los 220 días después de la primera inoculación, obteniéndose muestras de corazón, músculo esquelético e intestino grueso para la realización de un estudio histológico semicuantitativo. Durante el curso del experimento se determinó semanalmente la mortalidad y la presencia de parásitos en sangre periférica por observación microscópica directa. La mortalidad acumulativa al final del experimento fue del 15 % en los animales que recibieron una sola dosis de parásitos, en tanto que en los animales sometidos a sucesivas infecciones fue del 50 %. Los animales que recibieron una sola dosis mostraron parasitemia durante el primer mes postinfección la que se negativizó posteriormente; por el contrario, en el grupo que recibió infecciones sucesivas se observó una reaparición de la parasitemia durante las primeras dos semanas después de cada inoculación. La incidencia de infiltrados inflamatorios mononucleares en la capa muscular del intestino fue mayor en el grupo de infecciones múltiples (47 %), que en los que recibieron una sola dosis (17 %), en tanto que la incidencia de miocarditis y miositis fue similar para ambos grupos. La cuantificación de las lesiones reveló que los animales reinfectados presentaron mayor daño del músculo esquelético, no observándose diferencia en la intensidad de la miocarditis. De estos resultados se puede concluir que en la enfermedad de Chagas crónica del ratón no existe resistencia a nuevas reinfecciones, ya que las mismas producen una reaparición de la parasitemia, mayor mortalidad y mayor intensidad de las lesiones musculares esqueléticas e intestinales.

References

1. Andrade SG, Figueira RM, Andrade ZA: Influencia de infecções repetidas no quadro histopatológico da doença de Chagas Experimental. *Gaz Med Bahia* 68: 115, 1968.
2. Cohen S: Immunology of Parasitic Infections. (S. Cohen and E. H. Sadum, eds), Blakwell, Oxford, p 35, 1976.
3. Cossio PM, Diez C, Laguens RP, Arana RM: Inmunopatología de la enfermedad de Chagas. Hechos y Perspectivas. *Medicina (Bs Aires)* 40 (Supl 1): 222, 1980.
4. Kierszenbaum F, Howard JG: Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection; The importance of antibodies and antibody-forming capacity in

the Biozzi higher and low responder mice. *J Immunol* 116: 1208, 1976.
5. Laguens RP, Cabeza Meckert PM, Basombrío MA, Chambo GJ, Cossio PM, Arana R M, Gelpi R: Infección crónica del ratón con *Trypanosoma cruzi:* Modelo experimental de enfermedad de Chagas. *Medicina (Bs Aires)* 40 (Supl 1): 33, 1980.
6. Mitchell GF: Responses to infection with metazoan and protozoan parasites in mice. *Adv in Immunol* 28: 454, 1979.
7. Sergent, E: *In:* Immunity of Protozoa (Garnham PC, Pierce AE, Roitt I, eds). Blackwell, Oxford, 1963.
8. Silva GR: Doença da Chagas em familias de duas areas restrictas da cidade do Salvador, Bahía. Tesé - Salvador - Bahía, 1966. (Citado por Andrade SG).

— — — —

Even under the most urbanized conditions we retain the genetic constitution of our Stone Age ancestors and therefore can never be completely adapted, biologically, to the environment in which we live. Wherever we are and whatever we do, we cannot avoid being exposed to a multiplicity of physico-chemical and biological agents of disease. We survive only because we are endowed with biological and psychological mechanisms that enable us to respond adaptively to an immense diversity of challenges. This adaptive response may be so effective that most challenges do not result in disease. If disease occurs, the adaptive response commonly brings about spontaneous recovery without the need of medical intervention. Ancient physicians were so familiar with this natural power of the organism to control disease that they invented the beautiful expression, vis medicatrix naturae, *"the healing power of nature".*

Aun en las condiciones urbanas más propicias retenemos la constitución genética de nuestros antecesores de la Edad de Piedra, por lo cual nunca podemos estar completamente adaptados, biológicamente, al medio ambiente en que vivimos. Dondequiera que estemos y hagamos lo que hagamos, no podemos evitar estar expuestos a una multitud de agentes de enfermedad, físico-químicos y biológicos. Sobrevivimos solamente porque estamos dotados de mecanismos biológicos y psicológicos que nos capacitan para responder adaptativamente a una inmensa diversidad de ataques. Esta respuesta adaptativa es tan efectiva que la mayor parte de estos ataques no se traducen en enfermedad. Si la enfermedad ocurre la respuesta adaptativa habitualmente proporciona una recuperación espontánea sin necesidad de intervención médica. Los médicos antiguos estaban tan familiarizados con este poder natural del organismo para controlar la enfermedad, que inventaron la hermosa expresión, *vis medicatrix naturae,* "el poder curativo de la naturaleza".

René Dubos

Introduction in:
Anatomy of an illness as perceived by the patient.
Norman Cousins, W. W. Norton & Co.,
New York, 1978

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 549-555 (1981)

COMPARATIVE STUDIES ON INFECTIVITY AND SURFACE CARBOHYDRATES OF SEVERAL STRAINS OF *TRYPANOSOMA CRUZI*

STELLA M. GONZALEZ CAPPA °, A. M. KATZIN °°, N. AÑASCO, S. LAJMANOVICH

Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Differences in the shape of the bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* have come to the attention of investigators since the first description of the parasite [5, 7]. Intraspecific variation had formerly been related to the age of the trypomastigotes because in many *T. cruzi* strains the slender forms appeared early in the infection being gradually replaced by broad forms [5, 20]. In 1963, Brener and Chiari [4] reported that in some strains the population of circulating trypomastigotes evolves during infection in mice with a constant predominance of slender or broad forms; in addition, they described strains in which the circulating forms were predominantly stout. Since that communication many comparative studies had been conducted mainly on two strains, Y (slender) and Cl (stout), which had been considered as representative of two polar situations with regard to the morphology of the bloodstream forms; for both strains different physiologic and immunologic characteristics had been reported [2, 3, 13, 14, 16]. The purpose of this study is to analyse some chemical and biological characteristics of 6 strains of *T. cruzi*, 2 with a predominance of slender, one of stout and 3 of broad bloodstream forms, in order to determine if there is any relationship between any of the characteristics studied and the predominant trypomastigote shape.

Materials and methods

The strains of *Trypanosoma cruzi* used were: Tulahuén (Tul) isolated in Chile from a triatome bug [20]; Y, isolated from an acute Chagas' disease in Brasil [22]; AWP, RA and UP, isolated in Argentina from acute Chagas' diseases, and CA-I isolated in Argentina from a chronic myocarditis case [8]. All the strains are maintained by continuously transfer in mice. Bloodstream forms of the Y and RA strains are slender, those of the Tul, AWP and UP strains are broad and trypomastigotes of the CA-I are similar to those reported for stout strains [4].

The trypomastigotes were obtained from Rockland mice (outbred strain reared in our laboratories since 1965) infected with 1×10^5 or 1×10^6 parasites, on days 7, 10 and 12 post inoculation. Trypomastigotes purified by plain decantation, were washed and resuspended in PBS-albumin 1 [illegible].

Male Rockland mice, 25 days old 16 ± 2 g were inoculated with logarithmic doses of trypomastigotes by the intraperitoneal route (from 1 to 10^5 parasites). The follow up of the parasitemia was performed and the lethal doses 50 (LD_{50}) was evaluated [20, 21].

Concanavalin A (Con-A), wheat germ agglutinin (WGA) and soy bean agglutinin (SBA)

— — — —

Received: 29-IV-1981. Accepted: 6-V-1981.

° Member of Research Career, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

°° Fellow of CONICET.

Postal address: Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina.

were assayed by direct agglutination (DA) and direct fluorescence (DF) tests with mouse trypomastigotes (obtained after 7 or 12 days post infection) as reported earlier [12]. For the DF test the lectins used were conjugated with fluorescein isothiocyanate. The lectins employed for DA tests were purchased at Sigma Chemical Co., St. Louis, No. and those for the DF test at Pierce Chemical Co., Rockford, Il. DA was performed using 10^8 parasites/ml and DF with 10^7 parasites/ml. The concentrations of the lectins assayed in both tests ranged from 500 μg to 0.05 μg/ml [12]. The specificity of the reactions was determined by the use of 0.2 M of the specific competing sugars (α D. glucose, N. acetylglucosamine, α D. mannose, and α D. galactose).

Macrophages obtained as described by Cohn and Benson [6] from the peritoneal cavity of normal mice, were cultures on microcover glasses into Leighton tubes for 24 hours. The cultures were infected with trypomastigotes obtained from mice on the 7th, 10th or 12th days after infection, in a ratio of 10 parasites/cell, and were incubated during 48 hours at 33° C. Three hours after infection, the cultures were washed with 199 medium (Gibco, Grand Island, N. Y.) in order to eliminate free parasites. Medium 199 supplemented with 10 % bovine fetal calf serum (Gibco, Grand Island, N. Y.) was added for the rest of the incubation period. Thereafter, cultures were fixed with ethanol-ether and stained with Giemsa. For the CA-I strain, macrophages were stained not only at 48 hours after infection, but also at 3 and 24 hours. The percentage of infection was calculated as follows:

(Nº of macrophages infected/Total number of macrophages) x 100; no less than 2000 cells were evaluated.

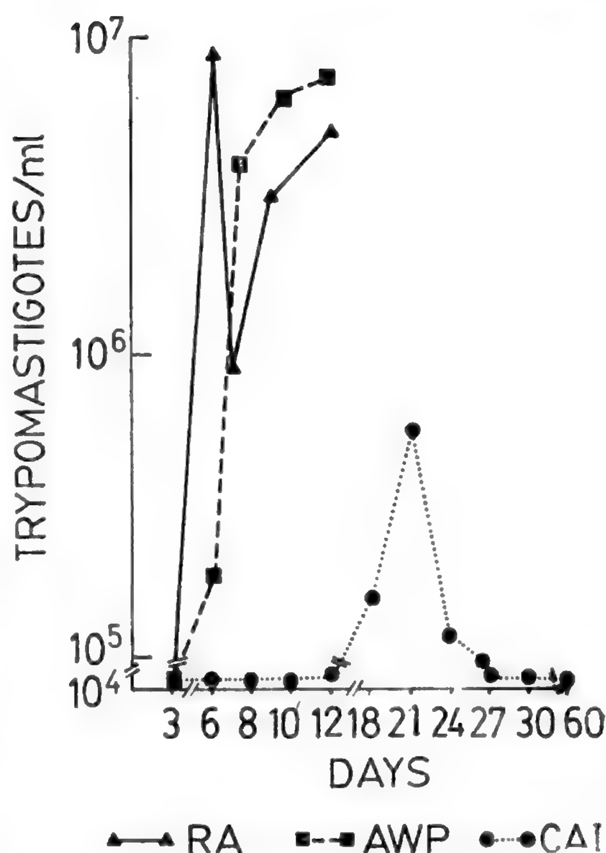


Fig. 1. — Parasitemias of mice inoculated with 10^6 trypomastigotes. The pattern of parasitemia of the Y strain is similar to that shown by the RA strain. The patterns of the Tul and UP strains are similar to that of the AWP strain. No death was registered before day 10.

Results

Even though broad bloodstream forms are the predominant population in the Tul, AWP and UP strains, and slender bloodstream forms are characteristic of the Y and RA strains, a predominance of bloodstream forms that are not considered as characteristic were detected sporadically. Therefore, we will refer to slender or broad predominant population when either surpasses the 75 % mark. The CA-I strain (stout) failed to show this type of morphologic variation.

The parasitemia induced by lethal doses of Tul, AWP and UP strains showed a logarithmic increasing pattern. Mice injected with RA, Y strains also showed a logarithmic increasing pattern reaching their highest point during days 6-9 (depending on the dose of parasites injected); this peak was followed on the next day by a decrease with a final increase of the circulating parasite (Fig. 1). Mice inoculated either with broad or with slender parasites died with high parasitemia (Fig. 1). The CA-I strain developed a slow ascending parasitemia that slowly decreased latter (Fig. 1). This strain was not lethal for mice 25 days old even if they were injected with 10^6 trypomastigotes. The lethal activity of the other strains was unrelated to the predominance of broad or slender forms for each strain. The LD_{50} values after 15 days post infection were 0.52×10^3 and 3.80×10^3 for RA and Y strains and 4.21×10^3, 5.17×10^3 and 0.58×10^3 for UP, AWP and Tul, respectively.

The carbohydrates found on the surface of trypomastigotes were independent of the day of infection from which the parasites were obtained. The presence of α D. glucose and α D. mannose was detected on trypomastigotes of all strains by DA and DF using 100 μg and 1 μg of Con-A, respectively. N. acetylglucosamine was also present on the surface of the trypomastigo-

TABLE 1. — *Usual reactivity of several strains of* T. cruzi *with lectins.*

Strains	Percentage of positive reactivity with:					
	Con - A		WGA		SBA	
	DA *	DF **	DA	DF	DA	DF
RA	100 (7) +	100 (8)	0 (7)	100 (8)	100 (7)	100 (8)
Y	100 (5)	100 (7)	0 (5)	86 (7)	100 (5)	100 (7)
UP	100 (5)	100 (5)	0 (5)	100 (5)	0 (5)	0 (5)
AWP	100 (5)	100 (8)	0 (5)	100 (8)	0 (5)	25 (8) °
Tul	100 (6)	100 (8)	0 (6)	100 (8)	17 (6) °	25 (8) °
CA-I	ND	100 (4)	ND ++	100 (4)	ND	0 (4)

*: Direct agglutination.
**: Direct fluorescence.
+: Percentage of positive reactivity (number of assays performed).
++: Not done.
°: Positive reactivity was coincident with a predominance of slender population.

tes of those strains as detected by DF (1 μg of WGA). Agglutination of this stage of the parasite was not found with any of the concentrations of WGA used. When SBA was assayed to detect α D. galactose broad strains (Tul, AWP and UP) neither reacted by DA nor by DF, whereas the RA and Y strains were positive with both tests (100 μg and 1 μg of SBA for DA and DF, respectively) (Table 1). In a few experiments (see Table 1) where the classic broad strains AWP and Tul showed a predominance of slender forms, the trypomastigotes tested bv DF were reactive with SBA. This reactivity was identical for the slender predominant population and for the broad forms present in these samples. The presence of surface carbohydrates in the CA-I strain was only assayed by DF and was found to be reactive with Con-A and WGA (1 μg each) but not with SBA (Table 1). The specificity of the lectin-parasite reactions was confirmed by the inhibition of reactivity obtained when the specific competing sugars were incorporated in the reaction.

In relation to macrophage infections the RA and Y strains showed the highest percent of infectivity (above 4 %); on ocassion, these strains showed values lower than 2 % (Table 2). On the other hand, the usual degree of infectivity of the broad strains (Tul, AWP, UP) was less than 2 %; however, occasionally these strains invaded higher percentage of macrophages (Table 2). In these experiments the CA-I strain was able to infect macrophages, but with the ratio of 10 parasites/cell used, the percentage of infected macrophages was never higher than 0.1 % and no damaged parasites were seen even

TABLE 2. — *In vitro infective activity of several strains of* T. cruzi *for macrophages*

Strains	Number of assays with different percentages of macrophages containing amastigotes +			
	over 4.0 %	between 3.9 % and 2.0 %	under 1.9 %	Neg
RA	5.98 ± 0.41 (5)*	2.77 ± 0.32 (2)	1.61 ± 0.16 (1)	— (0)
Y	9.14 ± 0.62 (4)	2.20 ± 0.36 (1)	1.66 ± 0.32 (2)	— (0)
UP	— (0)	— (0)	1.42 ± 0.34 (4)	— (0)
AWP	5.92 ± 0.95 (1)	— (0)	1.16 ± 0.13 (4)	— (0)
Tul	16.99 ± 0.34 (1)	2.97 ± 0.30 (1)	1.55 ± 0.13 (6)	— (0)
CA-I	— (0)	— (0)	— (0)	0.1 (3) **

+: Each assay was performed with 5 slides.
**: CA-I was only capable of infecting extremely low number of macrophages.
*: Percentage average of infected macrophages ± standard error (number of assays).

if cultures were discontinued 3 or 24 hours after infection (Table 2).

There was no relationship between the number of infected macrophages and the day of infection of the mice from which the parasites were recovered.

Discussion

The possibility that the differences in the morphological patterns which characterized the various strains of *T. cruzi* may have a special biological significance has been pointed out by Brener [2]. He reported the existence of strains with a predominance of slender, broad or stout bloodstream forms and observed a correlation between the morphology of the circulating trypomastigotes and the course of the parasitemia. For the slender strains he reported the same increase and decrease in blood parasites that we have found in the present study; however, in our experiments the parasitemia increased for a second time as the mice began to die with a high number of circulating trypomastigotes. In Brener's experiments mice died with low parasitemia. This difference might be due to the strain of mice used [23].

The patterns of parasitemia already reported for broad and stout forms are not those found in our studies. We obtained a constant increase of circulating parasites until the death of the mice with all the broad strains assayed. This pattern was reported previously for some stout strains by Brener [2]. On the other hand, Brener [2] reported for mice low mortality rate and low parasitemias for broad strains, a similar pattern to that showed by the CA-I strain (stout) in this study. However, Brener [2] had a low mortality rate with irregular and longlasting parasitemia for one out of the three broad strains. The pattern of parasitemia for broad and stout trypomastigotes might depend on the lethal capacity of the strain without close relationship to the morphology; those with high lethal activity may develop a constant ascending parasitemia while low and longlasting parasitemia may be induced by the strains with low lethal activity.

The positive reactivity between the bloodstream forms and lectins could not be due to any interference depending on host immunoglobulin adsorbed on, or specifically bound to, the surface membrane of the parasite because we failed to detect immunoglobulins adsorbed on parasites obtained at day 7 and similar results were reported by other authors [9, 14].

A correlation between strains with predominant slender population and the presence of α D. galactose on the membrane surface has been established. This carbohydrate was detected in circulating parasites of the RA and Y strains. In a number of experiments where the broad AWP and Tul strains showed a predominance of slender forms the α D. galactose was also found on the parasites' surface. However, even if it was only detected in relation to the predominance of slender population, when this sugar was present it was found not only on the slender predominant population but also on the lower number of the broad parasites contained in the sample. Recently, Pereira et al [19] have reported agglutination of the slender Y trypomastigotes by SBA while the absence of α D. galactose on the surface membrane of trypomastigotes had been reported previously for the broad Tul strain by Katzin et al [12]. As no capping was induced by these lectins (at least it was not detected in studies performed with the DF technique) the failure to detect α D. galactose in the broad strains surface as due to a capping mechanism induced by the SBA is very unlikely.

The results presented here with WGA are an extension to other strains of the results previously reported. N. acetylglucosamine was reported to be present on the surface of epimastigotes and trypomastigotes of the Tul strain [11, 12]. The receptors for WGA in the trypomastigote surface were detected only by DF [12]. The failure of agglutination of this stage with WGA was reported also for the Y strain [19].

We have found that the slender Y and RA strains were able to infect macrophages in vitro in a significantly higher percentage compared with the stout CA-I strain. On the other hand, those parasites that were capable of establishing them-

selves inside the macrophages evolve in the same way, despite the different degree of infection detected among the *T. cruzi* strains. Similar results had been reported by Alcántara [1] and Kipnis et al [15] for the slender Y and for the stout Cl strains. Further investigation is neccesary to elucidate if the presence of α D. galactose on the surface membrane of the slender *T. cruzi* strains is related to their higher infective capacity for in vitro macrophages.

Milder et al [17] working with hamster macrophages had observed a similar percentage of infection with the Y strain. They also had evaluated the behaviour of the F strain which is not lethal for the mouse and reported a low degree of macrophages infected after 48 hours (0.3 %) with higher initial penetration and ultimate destruction of the parasites. This low percentage of infected macrophages is similar to the data obtained in our studies for the CA-I strain and for the Cl by Alcántara [1]; but neither we nor Alcántara found higher initial penetration followed by damage and destruction of the parasites. That behaviour may depend on the particular strain of *T. cruzi* or on the different macrophages' species used by Milder et al.

On the other hand, Nogueira and Cohn [18] studying the interaction of trypomastigotes (Tul and Y strains) obtained form LIT cultures had reported higher infectivity (over 20 %) than that reported here using only a 1 parasite per macrophage rate. We obtain a similar high percentage of infection (over 20 %) using trypomastigotes from cultures (unpublisehd data). The attachment and ingestion of the LIT's trypomastigotes to the macrophages was inhibited by trypsin treatment [18]. Kipnis et al [15] had reported that treatment of macrophages with trypsin failed to interfere with the entry of bloodstream forms to the macrophage. The differences in the invasive mechanism between culture trypomastigotes and bloodstream forms indicate that, despite their similar morphology, both forms possess biologic differences; therefore it is not always possible to compare the results communicated for both types of trypomastigotes.

Summary

Trypomastigotes of six strains of T. cruzi, *two with a predominance of slender, one of stout, and three of broad bloodstream forms, were studied comparatively. A correlation between the predominance of slender population and the presence of α D. galactose on the surface membrane was found. The two slender strains were also those with the highest infective capability for macrophages in vitro while the stout one was scarcely infective. The tendency of slender forms to develop a parasitemia with an early rise and posterior decrease was confirmed in these studies.*

Resumen

ESTUDIOS COMPARATIVOS SOBRE INFECTIVIDAD Y CARBOHIDRATOS DE SUPERFICIE EN VARIAS CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*.

El estadío circulante (tripomastigote) del Trypanosoma cruzi *puede presentar diferente morfología; estas diferentes formas han sido denominadas delgada* (slender) *gruesa* (broad) *y rechoncha* (stout); *además se ha descripto la existencia de cepas en las que la población de parásitos circulantes es a predominio de una u otra forma durante todo el curso de la infección. En el presente estudio se analizaron algunas características biológicas y químicas en 6 cepas de* T. cruzi: *2 a predominio de formas delgadas (RA e Y), 3 a predominio de formas gruesas (AWP, UP y Tul) y 1 a predominio de formas rechonchas (CA-I). La evolución de la parasitemia en ratones Rockland de 25 días inoculados con las cepas RA e Y presentó un crecimiento logarítmico alcanzando su punto máximo entre los 6-9 días; este pico fue seguido primero de una caída y luego de un nuevo incremento del número de parásitos circulantes hasta la muerte del animal. Los ratones inoculados con las cepas AWP, UP o Tul no presentaron pico de parasitemia sino que la misma evolucionó con un incremento logarítmico hasta la muerte de los ratones. Todas estas cepas fueron letales para el ratón, pero la* DL_{50} *no se relacionó con el predominio de una*

u otra forma. Finalmente, la cepa CA-I no fue letal para el ratón y dio curvas de parasitemia bajas y prolongadas. Se verificó la existencia de algunos carbohidratos en la superficie de los tripomastigotes mediante la combinación de los mismos con lectinas. La especificidad de las reacciones lectina-parásito se determinó por la inhibición de las mismas mediante el agregado del azúcar competitivo específico. La reactividad entre lectinas y parásitos no puede atribuirse a la presencia de inmunoglobulinas del huésped adsorbidas a la superficie del mismo ya que la mayoría de los experimentos se realizaron con parásitos obtenidos a los 7 días de infección, momento en el cual ni nosotros ni otros autores, hemos podido detectarlas.

La presencia de α D. glucosa y α D. manosa se detectó por aglutinación directa (AD) y/o fluorescencia directa (FD) en tripomastigotes de las 6 cepas. Por el contrario, ninguna cepa reaccionó por AD cuando se la incubó en presencia de WGA; sin embargo, la existencia de N. acetilglucosamina fue detectada en la superficie de los tripomastigotes de todas las cepas por FD. Cuando se incubaron tripomastigotes de las cepas RA e Y (delgadas) con SBA se verificó, tanto por AD como por FD, la presencia de α D. galactosa expuesta. En cambio, las cepas a predominio de formas gruesas o rechonchas (AWP, UP, Tul y CA-I) fueron negativas frente a esta lectina. En algunos experimentos las cepas AWP y Tul, clásicamente gruesas, presentaron un predominio de formas delgadas y en esos casos se detectó α D. galactosa en su superficie. Cabe hacer notar que si bien este carbohidrato se encontró en la superficie de los parásitos sólo cuando la población fue a predominio de formas delgadas, las formas gruesas contenidas en esa determinada muestra también reaccionaron con SBA. La falta de reactividad entre SBA y cepas gruesas y rechonchas no puede deberse a inducción de capping *por la lectina ya que en experimentos realizados a 4° C tampoco se encontró reactividad. Las cepas RA e Y presentaron una neta tendencia a infectar más efectivamente macrófagos in vitro (por arriba del 4 %) a las 48 horas. Las cepas gruesas presentaron en la mayoría de los experimentos valores iguales o inferiores al 2 % y la CA-I fue capaz de infectar esta célula de manera extremadamente baja (0.1 %). Este bajo porcentaje de infección no puede atribuirse a destrucción de parásitos por el macrófago, ya que cultivos infectados con CA-I discontinuados y coloreados a las 3 y 24 horas no presentaron parásitos dañados en el interior de las células.*

Acknowledgments: This investigation received finantial support from the UNDP/World Bank/WHO (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases) and from Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología from Argentina. The authors are grateful to Dr. Irving G. Kagan for the editorial assistance.

References

1. Alcántara A: Interação in vitro entre *Trypanosoma cruzi* e macrófagos peritoneais do camundongo. Tese Doctor UFMG, 1979.
2. Brener Z: Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasit* 59: 19, 1965.
3. Brener Z: Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasites population distinct characterictics. *PAHO Scientific Publication* 347, 11, 1977.
4. Brener Z, Chiari E: Variações morfológicas observadas em diferentes mostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 5: 220, 1963.
5. Brumpt R: *Schyzotrypanum cruzi:* a différentes phases de son cycle évolutif. *Bull Soc Pathol Exot* 5: 261, 1912.
6. Cohn ZA, Benson B: The differentiation of mononuclear phagocytes: morphology, cytochemistry. *J Exp Med* 121: 153, 1965.
7. Chagas C: Nova trypanosomiasae humana: estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do *Schyzotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. agente etiológico de nova entidade morbida do homen. *Mem Inst Osw Cruz* 1: 159, 1909.
8. González Cappa SM, Chiale P, del Prado GE, Katzin AM, de Martini GW, Isola ELD de, Abramo Orrego J, Segura EL: Aislamiento de una cepa de *Trypanosoma cruzi* de un paciente con miocardiopatía chagásica crónica y su caracterización biológica. *Medicina (Bs Aires)* 40: 63, 1980.
9. González Cappa SM, Kloetzel J, Katzin AM, Dos Santos RR: *T. cruzi:* Activity of immunosera on surface antigens. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 22: 275, 1980.
10. Katzin AM, Lajmanovich S, González Cappa SM: Comparative stability of epimastigotes and trypomastigotes in different wash solutions. *J Parasit* 63: 925, 1977.
11. Katzin AM, Del Pino EJ, Cunio RM, Raisman JS, Olmos J, Lajmanovich S, González Cappa SM: Receptores para lectinas en la

superficie de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Bs Aires)* 39: 76, 1979.

12. Katzin AM, Lajmanovich S, González Cappa SM: Receptores para lectinas en la superficie de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Bs Aires)* 40 (1): 85, 1980.
13. Krettli AV, Brener Z: Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol* 116: 755, 1976.
14. Krettli AV, Weiz Carrington R, Nussenzweig RS: Membrane bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement mediated lysis. *Clin Exp Immunol* 37: 417, 1979.
15. Kipnis TL, Calich VLG, Díaz Da Silva W: Active entry of bloodstream forms of *T. cruzi* into macrophages. *Parasitology* 78: 89, 1978.
16. Mello RC, Brener Z: Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasit* 64: 475, 1978.
17. Milder RV, Kloetzel J, Deane MP: Observation on the interaction of peritoneal macrophages with *Trypanosoma cruzi* II. Intracellular fate of bloodstream forms. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 19: 313, 1977.
18. Nogueira N, Cohn Z: *Trypanosoma cruzi* mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J Exp Med* 143: 1402, 1976.
19. Pereira MEA, Loures MA, Villalta F, Andrade AFB: Lectin receptors as marker for *Trypanosoma cruzi*. Developmental stages and a study of the intraction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues of epimastigote cells. *J Exp Med* 152: 1375, 1980.
20. Pizzi T: Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Monografía Universidad de Chile (ed), p 183, 1956.
21. Reed JJ, Muench H: *In:* Davis BD, Dulbecco R, Eisem HN, Ginsger HS, Barry Wood W: Microbiology, Harper and Row, New York. Evanston & London (ed) p 663, 1973.
22. Silva LH, Nussenzweig V: Sobre una cepa do *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folha Clin Biol São Paulo* 20: 191, 1953.
23. Trischman T, Tanowitz H, Wittner M, Bloom R: *Trypanosoma cruzi*. Role of the immune response in the natural resistance of inbred strains. *Exp Parasit* 45: 160, 1978.

Para muchos hombres la esperanza vagabunda es un bien; para muchos es también un engaño de crédulos deseos, que se arrastra hacia quien no sabe que ha aproximado el píe a la llama viva.

SÓFOCLES, 495-406 a.JC

Antígona

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 556-564 (1981)

NECROSIS CARDIACA Y DEFICIENCIA DE FACTORES LIPOTROPICOS *

IBIS ARIENTI DE GARCIA, J. C. PERAZZO, A. J. MONSERRAT **

II Cátedra de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La necrosis cardíaca es una de las principales causas de morbi-mortalidad en los seres humanos. Con el propósito de reproducir esta entidad en animales de laboratorio se han propuesto diversos modelos experimentales, utilizando drogas, dietas, procedimientos quirúrgicos, etc. [15, 30, 40, 44, 49]. Alimentando a ratas recién destetadas con dietas hipolipotrópicas es factible inducir una serie de alteraciones, siendo las que ocurren en hígado —metamorfosis grasa y cirrosis— y riñón —necrosis tubular focal hasta necrosis cortical masiva [10, 23]— las que han sido estudiadas. Las lesiones cardíacas en este modelo experimental han recibido menor atención [8, 34, 45, 47]. El hecho de haber obtenido resultados distintos con respecto a los publicados o no mencionados en distintos trabajos, nos lleva a presentar nuestras observaciones en el estudio de la patología cardíaca en ratas alimentadas con dietas deficientes en factores lipotrópicos.

Material y métodos

Ratas Wistar machos, recién destetadas, provenientes del Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, fueron divididas de acuerdo a la alimentación recibida, en 4 grupos CD, CS, P y D. Las ratas del grupo CD fueron alimentadas con dieta deficiente en factores lipotrópicos (Dieta III de referencia [16]) las del grupo CS con la misma dieta suplementada con 0.35 % de cloruro de colina; las del grupo P con dieta comercial (Roedores, Purina de Argentina) y también se incluyó un grupo D, en el que los animales fueron sacrificados el mismo día del destete. Los animales fueron alojados en jaulas individuales ofreciéndoles alimento *ad libitum* a los grupos CD y P, en tanto que los del grupo CS fueron alimentados en forma pareada individual y diaria con respecto a los del grupo CD. Les fue ofrecida agua *ad libitum*, registrándose diariamente el peso corporal y la ingesta de alimento.

El número de ratas asignado a cada grupo así como la cantidad y día en que fueron sacrificadas (o murieron) están indicados en la Tabla 1.

Tanto en los animales que murieron, como en los sacrificados anestesiados con éter, el corazón, los pulmones y los riñones fueron pesados y luego fijados en formol-calcio e incluidos en parafina. Las secciones de corazón fueron coloreadas con hematoxilina-eosina (HE), ácido peryódico de Schiff (PAS), Tricrómico de Masson (TM), hematoxilina fosfotúngstica (PTAH), hematoxilina-fucsina básica-acido pícrico (HBFB)[18] y técnica

TABLA 1. — *Diseño experimental*

Grupo	Día 0	Día 3	Día 5	Día 8	Muertes *
CD	—	18	20	34	32
CS	—	14	11	29	—
P	—	—	7	16	—
D	18	—	—	—	—

* Días 7-11.

Recibido: 19-XII-1980. Aceptado: 25-III-1981.

* Presentado en el XVII Congreso Argentino de Patología, Buenos Aires, 1980.

** Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Dirección postal: II Cátedra de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, J. E. Uriburu 950, 1114 Buenos Aires, Argentina.

de Von Kossa, para calcio; las de riñón y pulmón con HE y PTAH.

Los cambios morfológicos buscados en las fibras miocárdicas fueron: miocitolisis [35], hialinosis [19], necrosis de coagulación [2], degeneración miofibrilar [32], bandas de contracción [32], fibras onduladas [4], fragmentación [4].

De acuerdo al estudio histológico, la necrosis tubular o cortical renal fue agrupada siguiendo una clasificación propuesta anteriormente [16].

Las comparaciones entre las medias se efectuaron utilizando la prueba de t, las diferencias menores de 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas [7].

Resultados

La ingesta de alimento en los distintos grupos fue similar a la observada en experimentos anteriores [26], observándose disminución en las del grupo CD a partir del 5º día.

Los pesos corporales iniciales, finales y máximos —cuando este último no coincidió con el peso corporal final— están indicados en la Tabla 2. Como consecuencia de la disminución de la ingesta de alimento, el peso final de las ratas del grupo CD sacrificadas al 8º día y de las que murieron a causa de la enfermedad inducida, es menor que el peso corporal máximo. Lógicamente lo mismo ocurrió en las ratas CS sacrificadas al 8º día, ya que fueron alimentadas en forma pareada con respecto al grupo CD.

Los riñones de los animales D, CS y P presentaron características normales. En las ratas del grupo CD no se observaron alteraciones al 3er. día, en tanto que al 5º día 10/20 ratas mostraron necrosis tubular grado 1.5 ± 0.5 ($\bar{x}$ ± ES). Al 8º día 33/34 animales presentaron necrosis renal, siendo en 19 de tipo tubular grado 2.9-0.3 y en 14 de tipo cortical grado 6.7 ± 0.2. De los animales que murieron 32/32 presentaron necrosis renal, siendo en 6 de tipo tubular grado 4.0 ± 0.0 y en 26 de tipo cortical grado 6.6 ± 0.2. Las características de estos riñones fueron similares a las ya descriptas [5, 23, 28]. El peso renal en los distintos grupos está indicado en la Tabla 2. El mismo está notoriamente aumentado en las ratas CD sacrificadas al 8º día (CD vs CS $p < 0.001$) y en las que murieron; en las CD sacrificadas al 5º día el peso renal fue mayor en las que tenían necrosis renal en comparación con los que no presentaron tal lesión, ya sea expresando el resultado en mg, 770.6 ± 49.4 vs 689 ± 40.8 (NS) o en mg/100 gm pc, 1407.8 ± 68.1 vs 1206.4 ± 39.2 ($p < 0.02$). El estudio de los pulmones de los animales de los distintos grupos no

TABLA 2. — *Peso corporal, cardíaco y renal ($\bar{x}$ ± ES)*

Grupo	n	Día	Corporal (g)			Cardíaco		Renal	
			Inicial	Final	Máximo	mg	mg/100 g pc	mg	mg/100 g pc
D	18	0		48.6 ± 0.9		266 ± 5	549 ± 11	613 ± 12	1267 ± 32
CD	18	3	48.7 ± 2.6	53.6 ± 2.8		310 ± 15 (8)[a]	490 ± 20	665 ± 33	1248 ± 25
CS	14	3	46.1 ± 4.0	49.8 ± 4.3		334 ± 11 (6)	499 ± 21	649 ± 45	1329 ± 34
CD	20	5	44.8 ± 1.5	56.1 ± 2.1		338 ± 12 (11)	554 ± 14	730 ± 33	1307 ± 45
CS	11	5	47.8 ± 2.9	54.3 ± 4.3		361 ± 35 (5)	536 ± 27	687 ± 48	1280 ± 28
P	7	5	50.5 ± 2.1	67.6 ± 2.3		370 ± 24 (5)	566 ± 31	840 ± 28	1233 ± 43
CD	34	8	46.2 ± 1.1	55.2 ± 1.9	59.8 ± 1.8[b]	356 ± 15 (24)	606 ± 18	1484 ± 69	2722 ± 116
CS	29	8	44.0 ± 1.6	48.0 ± 2.5	53.9 ± 2.5[c]	302 ± 15 (17)	548 ± 17	651 ± 27	1385 ± 29
P	16	8	53.5 ± 2.3	82.5 ± 3.9		426 ± 20 (13)	513 ± 15	940 ± 35	1158 ± 43
CD	32	muertas	43.2 ± 1.0	43.6 ± 1.1	51.8 ± 1.4[d]	—	—	1365 ± 43	3130 ± 68

a, n; b, día 6.3 ± 0.2; c, día 6.0 ± 3; d, día 5.4 ± 0.2.

TABLA 3. — *Patología cardíaca en el grupo CD*

Día n Ventrículo	3 18 D	 I	5 20 D	 I	8 34 D	 I	Muertas 32 D	 I
Pericarditis fibrinosa o hemorrágica		1			2	1		
Trombos hialinos			1	1	2	3	3	1
Aflujo y/o infiltrados leucocitarios					1	1	6	3
Hemorragia intramural		1		1	4	4	5	4
Calcificación							6	2
Material proteico intersticial					6	1	11	3
Miocitolisis		2	3		4	3	2	1
Hialinosis					10	10	9	7
Necrosis					7		12	1

mostró variaciones importantes entre los mismos ni en cuanto al peso ni en cuanto a la morfología . No se observó patología pulmonar de significación en ninguno de los grupos.

El peso cardíaco de los animales de los distintos grupos está indicado en la Tabla 2. Se observa un incremento al 8º día en el grupo CD en comparación con el grupo CS, ya sea en valores absolutos ($p < 0.02$) o como porcentaje del peso corporal ($p < 0.05$).

Los corazones de los grupos D, CS y P no mostraron alteraciones. La patología cardíaca hallada en las ratas del grupo CD está resumida en la Tabla 3.

La hialinosis se observó a cualquier nivel del espesor de la pared miocárdica, incluyendo cambios transmurales. Al 8º día predominó la localización subpericárdica, en tanto que en los que murieron fue más frecuente la forma transmural. La miocitolisis fue usualmente intramural (Fig. 1).

La necrosis de coagulación se observó mucho más frecuentemente en ventrículo derecho (Fig. 2). Al 8º día 7/34 animales mostraron necrosis cardíaca. En los 7 casos coexistía necrosis renal, siendo en 3 del tipo tubular grado 4 y en 4 de tipo cortical. En estas 7 ratas la necrosis cardíaca era transmural en 4 y en el resto intramural o subpericárdica. El único animal que al 8º día mostró necrosis renal, tampoco tenía necrosis cardíaca.

En los que murieron a causa de la enfermedad, 12/32 presentaron necrosis en ventrículo derecho. En los 12 casos coexistía necrosis renal, siendo en 2 de tipo tubular, grado 4, y en 10 de tipo cortical. En estos 12 animales la necrosis miocárdica fue transmural en 10 y en los otros 2 intramural o subpericárdica.

La necrosis de ventrículo derecho estaba localizada en cara póstero-lateral, extendiéndose frecuentemente al tabique. En el caso en que se observó necrosis de ventrículo izquierdo, coexistían lesiones extensas de necrosis en ventrículo derecho.

Las hemorragias observadas en los corazones variaron desde pequeños focos hasta comprometer áreas extensas; la misma se observó conjuntamente con necrosis o como principal cambio.

El material proteico intersticial mostró usualmente aspecto fibrilar y se encontró en áreas de necrosis o en zonas contiguas a las mismas. Tintorialmente se caracterizó por ser PAS y PTAH positivo y tomar color rojizo con el T.M., características morfológicas y tintoriales compatibles con fibrina. Si bien junto con la necrosis se observó aflujo de poli y mononucleares, también se mostró presencia de los mismos sin necrosis de coagulación concomitante.

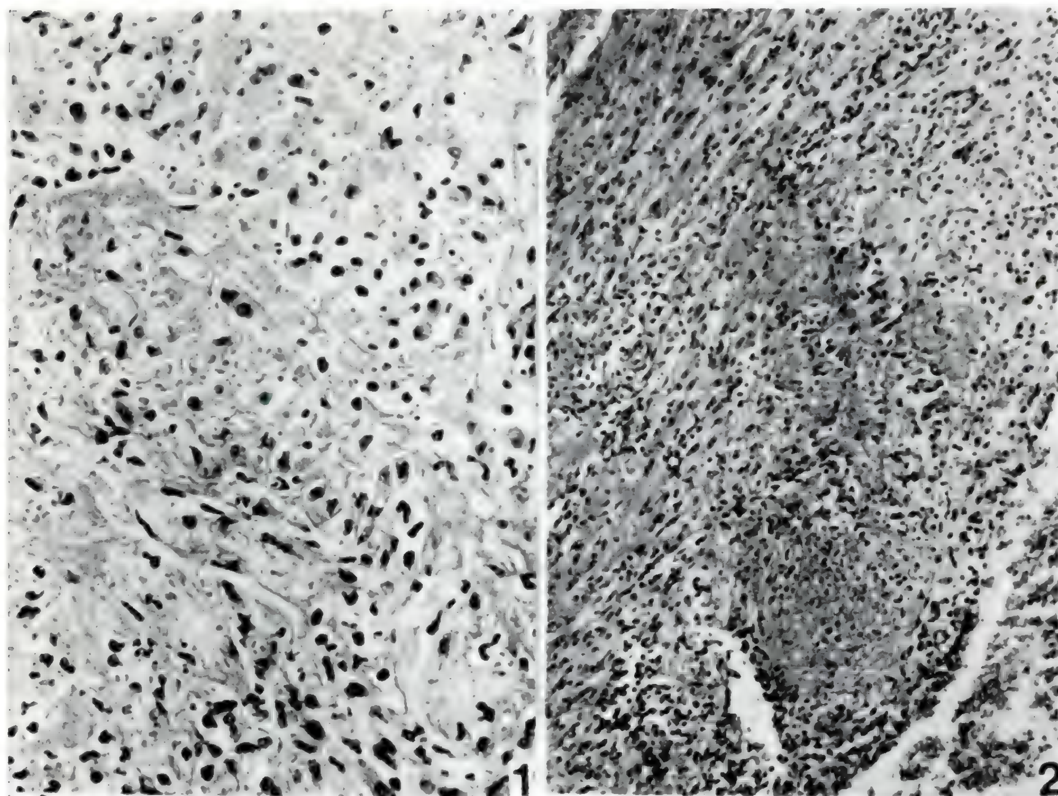
La presencia de trombos en capilares fue hallazgo infrecuente.

No se observaron alteraciones de los vasos coronarios.

La fucsinofilia en secciones coloreadas con HBFB fue hallazgo común en los animales que mostraron hialinosis y coincidió en su localización con estos cambios; las áreas necróticas fueron negativas.

Los depósitos de calcio coincidían en general con las áreas necróticas, si bien en ocasiones fueron observadas con hialinosis o aflujo de polimorfonucleares.

No se observaron bandas de contrac-



Figs. 1-2. — 1, Ventrículo derecho. Miocitolisis aledaña a una zona de necrosis de coagulación (Grupo CD, murió al 8º día). (H. E. x 500); 2, Ventrículo derecho. Necrosis de coagulación transmural y presencia de células poli y mononucleadas (Grupo CD, murió al 8º día). (H. E. x 145).

ción, degeneración miofibrilar, fragmentación o fibras onduladas.

Como lo muestra la Tabla 3, la incidencia de lesiones se incrementó a medida que se prolongaba la deficiencia de colina.

Discusión

Diversos modelos capaces de inducir necrosis cardíaca han sido extensamente estudiados. Por el contrario, las lesiones cardíacas que ocurren en la deficiencia de factores lipotrópicos —colina, metionina, B 12 y ácido fólico— han recibido menor atención, siendo el siguiente un resumen de las publicaciones existentes sobre este tema. Engel y Salmon [8], en ratas de 23 días de edad y alimentadas con dieta deficiente en colina durante 6 a 14 días, encuentran hemorragia e infiltrados leucocitarios tanto en el ventrículo derecho como en el izquierdo; frecuentemente observan necrosis extensa de las fibras musculares en las áreas severamente afectadas. Wilgram, Hartroft y Best [47] en ratas de 70 a 120 g observaron, en ambos ventrículos y septum, degeneración miocárdica, miocarditis intersticial, infiltrados de células inflamatorias y frecuentemente áreas de necrosis focal. Los cambios cardíacos se iniciaban con el depósito de grasa en las células miocárdicas. Encuentran una relación entre el valor hipolipotrópico de la dieta y el daño cardíaco y animales con lesiones cardíacas y sin lesiones renales; esta última proporción es mayor en ratas alimentadas con dietas que contienen triglicéridos sintéticos que en aquellas que contienen triglicéridos naturales. Wilgram y Hartroft [46] observan que los cambios cardíacos comienzan por metamorfosis grasa; posteriormente las células se tumefactan, se vacuolizan y necrosan. Con la necrosis y lisis de las células

musculares, las gotas de grasa pasan al intersticio donde son englobadas por macrófagos; en los estadíos avanzados de la lesión las células cardíacas contienen poca grasa. Al comienzo de la necrosis hay abundantes polimorfonucleares, luego mononucleares y proliferación de fibroblastos. Los autores sugieren que el mecanismo patogénico inicial es el depósito de grasa en las células miocárdicas. Estudiando la vascularización cardíaca con inyecciones de tinta china, concluyen que la degeneración y la necrosis celular no son de origen isquémico. Asimismo, observan depósitos de lípidos en las coronarias con eventual presencia de hiperplasia endotelial y estrechamiento de la luz. Wilgram, Best y Blumenstein [45] encuentran que suministrando a ratas hembras, alimentadas con dieta deficiente en colina, hormona de crecimiento y/o testosterona aumenta el daño renal y cardíaco. Salmon y Newberne [34] encuentran necrosis cardíaca, sin precisar localización en ratas alimentadas con dieta deficiente en colina, y que contiene un 34 % de lípidos en su composición. Así, en estas ratas descubren lesiones coronarias que llegan hasta la necrosis; en un pequeño porcentaje observan oclusión parcial o total de la arteria coronaria.

El peso cardíaco está aumentado en nuestro erperimento en las ratas que presentan mayor daño en corazón. La necrosis cardíaca observada en el mismo plantea distintos interrogantes, tales como su posible relación con la necrosis renal, papel de la metamorfosis grasa en su desarrollo, su localización casi exclusiva en ventrículo derecho, significado de las secuencias morfológicas observadas e importancia de la dieta utilizada. Con la dieta y cepa de ratas utilizadas en este experimento se observa una alta incidencia de daño renal [16]. Si bien tanto al 8º día como en las que murieron, todas las ratas que mostraron necrosis cardíaca tenían también necrosis tubular extensa o necrosis cortical, dada la alta incidencia de necrosis renal es factible que sea mera coexistencia de lesiones. Por otra parte, en pacientes urémicos no se ha observado necrosis cardíaca [17]. Si bien en los animales utilizados por nosotros existen alteraciones de la hemostasia del tipo de la coagulación por consumo [25, 42], con coagulación intravascular a nivel renal posiblemente inducida por la necrosis tubular [25], no hemos encontrado a nivel cardíaco trombos precediendo a la necrosis y luego de la instalación de la misma la incidencia de depósitos de fibrina en capilares no fue muy importante y nunca se observaron en vasos coronarios de mayor calibre. Por otra parte el papel patogénico de la trombosis coronaria tanto en el infarto observable en los seres humanos [13, 21] como en el experimental inducido por dieta [48], ha perdido valor y actualmente se postula que la trombosis coronaria sería un cambio posterior al daño miocárdico. Por el contrario pequeños o grandes focos de hemorragia fueron encontrados en ventrículo derecho; pudiera ser que los mismos estén relacionados con la coagulopatía por consumo que presentan estos animales.

La liberación de catecolaminas es aceptada como un importante mecanismo de daño miocárdico [3, 15, 41]. Cabe mencionar que uno de los mecanismos propuestos para la necrosis renal observable en ratas alimentadas con dieta deficiente en colina, es el que sugiere que la misma se produce como consecuencia de un predominio del sistema vasoconstrictor, ya sea debido a un vasospasmo consecutivo a la disminución de acetilcolina [29] o al aumento de catecolaminas [6]. No existen mediciones de estas sustancias a nivel cardíaco en este modelo experimental. Por otra parte, la lesión cardíaca que más se acepta como consecutiva a las catecolaminas es la denominada degeneración miofibrilar [32], que no fue observada por nosotros en el presente experimento, y en animales inyectados con catecolaminas las lesiones se encuentran en ambos ventrículos y predominantemente en el izquierdo [12, 33, 39].

A la denominada miocitolisis alveolar [35] se podría llegar a través de distintas alteraciones previas [2]. Nosotros no hemos observado estadíos que puedan preceder este tipo de cambio.

Lesiones predominantes en ventrículo derecho han sido descriptas en el *stress* [35] y las mismas podrían estar condicionadas o desencadenadas por la hipopotasemia que ocurría en dichas condiciones experi-

mentales [22, 30, 37]. Los animales CD están en *stress* como consecuencia del daño renal, hecho objetivable en la hiperplasia adrenal [31] e involución tímica [1, 10]. Si bien reciben potasio en cantidades adecuadas en la dieta, la ingesta llega a ser muy baja luego del daño renal [23]. Aunque estas ratas están en insuficiencia renal aguda [27] con niveles elevados de potasio en plasma [31] es conocido que, al menos en pacientes con insuficiencia renal crónica, el contenido de potasio de músculo esquelético está disminuido [40]. Por otra parte, en perros nefrectomizados mantenidos con diálisis peritoneal con el agregado de urea al líquido de diálisis y consiguientemente con niveles en plasma altos de urea y normales de electrolitos, se ha observado caída en el contenido de potasio en músculo esquelético, pero no en músculo cardíaco [11]. Dado que no ha sido medido el potasio en el miocardio de ratas deficientes en colina, el posible papel que alteraciones de este ion pueden tener es especulativo.

Debido al cuadro clínico final que presentan los animales CD sería factible pensar que están en shock. Sin embargo, Sobin y Landis [38] no encontraron diferencias en la presión arterial con respecto a animales controles. Por otra parte en perros con shock hemorrágico experimental [20], las lesiones se encuentran en el subendocardio de ambos ventrículos, si bien afectan preferentemente al derecho. No tenemos una explicación para la diferente localización observada por nosotros y otros autores. Podría ser que la composición de la dieta haya influido, ya que en los trabajos anteriores se han utilizado en general dietas ricas en lípidos y frecuentemente, con el agregado de colesterol.

La necrosis del ventrículo derecho como complicación del infarto de ventrículo izquierdo ha sido descripta [14]. También han sido descriptas en niños malformaciones cardíacas que llevan a una mayor función del ventrículo derecho [9]; si bien nuestro experimento es agudo, no se encontraron alteraciones pulmonares que justifiquen una sobrecarga de ventrículo derecho.

Una hipótesis para explicar la necrosis tubular renal que se observa en este modelo sugiere al daño en los lisosomas como mecanismo patogénico [24]; el papel que los lisosomas pueden jugar en los mecanismos de muerte celular a nivel cardíaco es incierto [43]. Existe por lo tanto la posibilidad que un daño lisosómico también esté involucrado en el desarrollo de las lesiones cardíacas en este modelo.

Creemos que no existen en la actualidad suficientes pruebas para intentar una hipótesis plausible del mecanismo patogénico de la necrosis cardíaca que aparece en ratas alimentadas con dietas hipolipotrópicas ni para explicar su localización. De las distintas posibilidades, las más plausibles parecieran ser la de atribuir esta necrosis al término vago de *stress* consecutivo al daño renal, o a una consecuencia metabólica de la deficiencia de colina.

Resumen

Alimentando a ratas destetadas con dietas deficientes en factores lipotrópicos es factible inducir una variada patología, siendo las lesiones hepáticas y renales las que han recibido preferente atención. Con el propósito de estudiar la patología cardíaca en este modelo experimental, ratas Wistar, machos, recién destetadas, fueron divididas en 4 grupos. Las del grupo CD (n: 104) recibieron ad libitum *dieta deficiente en factores lipotrópicos; las del grupo CS recibieron la misma dieta, suplementada con colina y en forma pareada con respecto al CD; las del P recibieron dieta comercial* ad libitum *y las D fueron sacrificadas el día del destete. Ratas de los grupos CD, CS y P fueron sacrificadas a los 3, 5, 8 días; un lote CD fue mantenido en la dieta hipolipotrópica hasta su muerte (días 7 a 12). Los grupos CS, P y D mostraron pulmones, riñones y corazones normales. En el grupo CD los pulmones no difirieron de los controles. Se observó necrosis renal en 10/20 ratas al 5º día, en 33/34 al 8º y en 32/32 en las que murieron. Se observó necrosis de coagulación en miocardio en el 21 % de las ratas CD al 8º día en el 38 % de las que murieron. Abundantes células poli y mononucleares fueron observadas junto con la necrosis y ocasionalmente en forma aislada. Se halló hemorragia focal o extensa*

conjuntamente con la necrosis o como único cambio. La necrosis se localizó en la cara póstero-lateral de ventrículo derecho extendiéndose frecuentemente al tabique y en un caso al ventrículo izquierdo. No se observaron cambios en vasos coronarios. Los resultados obtenidos difieren de los observados por otros autores, principalmente en cuanto a la localización de la necrosis, la que podría ser consecutiva al "stress" *inducido por la enfermedad renal o una consecuencia metabólica de la deficiencia de colina.*

Summary

CARDIAC NECROSIS AND LIPOTROPIC FACTOR DEFICIENCY.

It is known that weanling rats, fed a lipotropic factors (choline, methionine, B12, folic acid) deficient diet, show different morphological and functional alterations. Renal and hepatic changes have been extensively studied. However, the cardiac pathology occurring in these animals has not been so extensively studied. The fact that we have obtained results different from those reported by others or not mentioned previously is the reason for the publication of this paper. Weanling, Wistar, male rats were allotted to 4 groups: CD group, rats fed ad libitum *a choline-deficient diet; CS group, rats were individually and daily pair fed with those in the CD group, and fed the same diet supplemented with choline chloride; P group, rats were fed* ad libitum *a standard commercial diet and finally those rats in the D group were killed the same day of weaning. Animals in group CD, CS and P were killed at the 3rd, 5th and 8th day; a CD sub-group was fed the choline-deficient diet until they died (7-12 days) (Table 1). Initial and final body weight, kidney and heart weights are indicated in Table 2. Those rats in group CS, P and D showed lungs, heart and kidney within normal features. In the CD group the lungs were not different from those o fthe control groups. In the same group renal necrosis was found in 10/20 rats at the 5th day, in 33/34 at the 8th day and in 32/32 in those dying during the experimental period. Coagulation necrosis (Fig. 2) in the heart was observed in 21 % of the CD rats at the 8th day in 38 % in those that died. Numerous mono and polinucleated cells were found together with necrosis or, ocasionally, without necrosis. Focal or extensive hemorrhage was observed together with the necrosis or as an isolated change. The coagulation necrosis was found in the postero-lateral wall of the right ventricle; extension towards the septum was frequently observed and in one rat the left ventricle was also involved. No changes were found in coronary vessels. The changes found in the heart of the CD rats are indicated in Table 3. The results obtained are partially different from those previously reported, mainly in relation to the localization of the necrosis. This necrosis could be due to the stress induced by the renal change, or as a consequence of the methabolic alterations due to the stress induced by renal damage, or as a consequence of the metabolic alterations due to choline deficiency.*

Agradecimientos: Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). Agradecemos la asistencia técnica prestada por María Mansilla de Fernández.

Bibliografía

1. Arienti de García I, Carballido J, Monserrat AJ: Patología tímica y esplénica en ratas deficientes en factores lipotrópicos. *Arch Latinoamericanos Nutr* (en prensa).
2. Baroldi G: Different types of myocardial necrosis in coronary heart disease: A pathophysiologic review of their functional significance. *Am Heart J* 89: 742, 1975.
3. Bloom S, Cancilla P: Myocitolisis and mitochondrial calcification in rat myocardium after low dosis of isoproterenol. *Am J Path* 54: 373, 1969.
4. Bouchardy B, Majno G: Histopathology of early myocardial infarcts. A new approach. *Am J Path* 74: 301, 1974.
5. Christensen K: Renal changes in the albino rat on low choline and choline-deficient diets. *Arch Path* 34: 633, 1942.
6. Costa RS, Rossi MA, Oliveira JSM: Pathogenesis of the renal injury in choline deficiency: the role of catecholamines and acetylcholine. *Br J Exp Path* 60: 613, 1979.
7. Dixon WJ, Massey FJ: Introduction to statis-

tical analysis. 2nd ed. McGraw-Hill, Toronto, 1957.
8. Engel RW, Salmon WD: Improved diets for nutritional and pathologic studies of choline deficiency in young rats. *J Nutr* 22: 109, 1941.
9. Franciosi R. Blanc WA: Myocardial infarcts in infarts and children. I. A necropsy study in congenital heart disease. *J Pediat* 73: 309, 1968.
10. Griffith WH, Nye JF: Effect of deficiency. *In:* The Vitamins, Section X, chapter 6: Choline, Vol. III, 2ª ed. Ed. por W. H. Sebrell and R. S. Harris. Academic Press, New York, p. 81, 1971.
11. Grollman EF, Grollman A: Toxicity of urea and its role in the pathogenesis of uremia. *J Clin Invest* 38: 749, 1959.
12. Handforht CP: Isoproterenol induced myocardial infarction in animals. *Arch Pathol* 73: 161, 1962.
13. Hellstrom HR: Myocardial infarct as a cause of coronary thrombosis. *Circulation* 42: 165, 1970.
14. Isner JM: Roberts WC: Right ventricular infarction complicating left ventricular infarction secondary to coronary heart disease. *Am J Cardiol* 42: 885, 1978.
15. Kahn DS, Roma G, Chappel CJ: Isoproterenol induced cardiac necrosis. *Am N Y Acad Sci* 156: 285, 1969.
16. Konopka HF, Arienti de García I, Monserrat AJ: Necrosis renal por deficiencia de factores lipotrópicos. Influencia de la dieta y cepa de ratas. *Medicina (Bs. Aires)* 38: 233, 1978.
17. Langendorf R, Pirani CG: The heart in uremia, an electrocardiographic and pathologic study. *Am Heart J* 33: 282, 1947.
18. Lie JT, Holley KE, Kampa WR, Titus JL: New histochemical method for morphologic diagnosis of early stages of myocardial ischemia. *Mayo Clin Proc* 46: 319, 1971.
19. Mallory GK, White PD, Salcedo Salgar J: The speed of healing of myocardial infarction. A study of the pathologic anatomy in seventy two cases. *Am Heart J* 18: 647, 1939.
20. Martin AM, Hackel DB: The myocardium of the dog in hemorrhagic shock. A histochemical study. *Lab Invest* 12: 77, 1963.
21. Milei R, Núñez A, Vasquez A, Bolomo N: La patología del infarto agudo de miocardio. Correelación entre morfología y función. *Medicina (Bs Aires)* 40: 302, 1980.
22. Molnar Z, Larjen K, Spargo B: Cardiac changes in the potassium depleted rat. *Arch Pathol* 74: 339, 1962.
23. Monserrat AJ: Injuria renal nutricional. Estudios experimentales. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires, 1978.
24. Monserrat AJ, Hamilton F, Ghoshal AK, Porta EA, Hartroft WS: Lysosomes in the pathogenesis of the renal necrosis of choline deficient rats. *Am J Pathol* 68: 113, 1972.
25. Monserrat AJ, Musso AM, Tartas N, Nicastro NA, Konopka HF, Arienti de García I. Sánchez Avalos JC: Consumption coagulopathy in acute renal failure induced by hypolipotropic diets. *Nephron* (en prensa).
26. Monserrat AJ, Porta EA, Hartroft WS: Sequential renal changes in choline deficient wealing rats. Conventional and electron histochemistry. *Arch Path* 85: 419, 1968.
27. Montes de Oca M, Perazzo JC, Monserrat AJ, Arrizurieta de Muchnik EE: Acute renal failure induced by choline deficiency structural functional correlations. *Nephron* 26: 41, 1980.
28. Moore HC: The acute renal lesions produced by choline deficiency in the male weanling rat. *J Path Bact* 74: 171, 1957.
29. Nagler A, Dettbarn WD, Seifter E, Levenson SM: Tissue levels of acetyl choline and acetyl cholinesterase in weanling rats subjected to acute choline deficiency. *J Nutr* 94: 13, 1968.
30. Nickerson M, Karr GW, Dressel PF: Pathogenesis of "electrolyte-steroid-cardiopathy. *Circ Res* 9: 209, 1961.
31. Olson RE, Deane HW: A physiological and cytochemical study of the kidney and the adrenal cortex during acute choline deficiency in weanling rats. *J Nutr* 39: 31, 1949.
32. Reichenbach DD, Benditt EP: Myofibrilar degeneration, a response of the myocardial cell to injury. *Arch Pathol* 85: 189, 1968.
33. Rona G, Chappel CI, Balasz T, Gaudry R: An infarct like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *Arch Pathol* 67: 443, 1959.
34. Salmon WD, Newberne PM: Cardiovascular disease in choline-deficient rats. *Arch Pathol* 73: 190, 1962.
35. Schlesinger MJ, Reiner L: Focal myocytolisis of the heart. *Am J Pathol* 31: 443, 1955.
36. Selye H: The humoral production of cardiac infarcts. *Br Med J* 1: 599, 1958.
37. Selye H, Bajusz E: Sensitization by potassium deficiency for the production of myocardial necrosis by stress. *Am J Pathol* 35: 525, 1959.
38. Sobin SS, Landis EM: Blood pressure of the rat during acute and chronic choline deficiency. *Am J Pathol* 148: 557, 1947.
39. Van Vliet PD, Burchell HB, Titus JL: Focal myocarditis associated with pheochromocytoma. *N Engl J Med* 274: 1102, 1966.
40. Villamil MF, Yeyati N, Rubianes C, Taquini AC: Water and electrolyte of muscle in chronic renal failure. *Acta Physiol Latino Amer* 13: 184, 1963.
41. Waldenstrom AP, Hjalmarson AC, Thornell L: A possible role of noradrenaline in the development of myocardial infarction. An experimental study in the isolated rat heart. *Am Heart J* 95: 43, 1978.
42. Wells IC: A blood clotting defect in choline deficient rats. *Biochem Biophys Acta* 86: 339, 1964.
43. Wildenthal K: Lysosomal alterations in ischemic myocardium: Result or cause of myocellular damage? *J Mol Cel Cardiol* 10: 595, 1978.

44. Wildenthal K, Decker RS, Poole AR, Griffin EE, Dingle JT: Sequential lisosomal alterations during cardiac ischemia. I. Biochemical and immunohistochemical changes. *Lab Invest* 38: 656, 1978.
45. Wilgram GF, Best CH, Blumenstein J: Effect of hormones and testosterone on induction of cardiovascular changes in choline-deficient rats. *PSEBM* 91: 620, 1956.
46. Wilgram GF, Hartroft WS: Pathogenesis of fatty and sclerotic lesion in the cardiovascular system of choline-deficient rats. *Br J Exp Pathol* 36: 298, 1955.
47. Wilgram GF, Hartroft WS, Best CH: Dietary choline and the maintenance of the cardiovascular system in rats. *Br Med J* 1, 1954.
48. Wilson RB, Hartroft WS: Pathogenesis of myocardial infarcts in rats fed a thrombogenic diet. *Arch Pathol* 89: 457, 1970.
49. Wilson RB, Hartroft WS, Conen PE, Anderson DE, Newberne PM: Early changes in myocardium of rats fed an infarct-producing diet. *Arch Pathol* 91: 307, 1971.

— — — —

Reparad que las filosofías más profundas apenas si persiguen otra finalidad que la total extirpación del amor propio, lo que quiere decir que es meta tan alejada que nadie puede temer alcanzarla.

JUAN DE MAIRENA

Sentencias, apuntes y recuerdos de un profesor apócrifo, 1943

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 565-572 (1981)

MASA MITOCONDRIAL EN MIOCARDIO E HIGADO DE RATA EN LA HIPOXIA HIPOBARICA CRONICA *

LIDIA E. COSTA **, O. KOCH ** A. BOVERIS **, A. C. TAQUINI **

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Instituto de Química Biológica y Centro de Patología Experimental, II Cátedra de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

A pesar de los cambios que ocurren en los sistemas respiratorio y cardiovascular durante la adaptación a la hipoxia hipobárica crónica, la pO_2 de la sangre venosa mixta cae por debajo de los valores correspondientes al nivel del mar en relación directa con la altura [14]. Esto ha urgido a los investigadores a buscar cuáles son las adaptaciones histológicas y bioquímicas que compensan la disminución de la pO_2 en la sangre capilar. En el corazón de los animales adaptados a la hipoxia hipobárica, la difusión intratisular del oxígeno se encuentra favorecida por el aumento de la mioglobina [8], que facilita su transporte, y probablemente por un aumento en la densidad capilar [25], que disminuye la distancia que el oxígeno debe recorrer hasta los sitios en que se consume. En el hígado, por la ausencia de mioglobina y por la naturaleza de los sinusoides hepáticos, estos cambios no existen. Como la utilización del oxígeno tiene lugar predominantemente en las mitocondrias, también se ha sugerido que la existencia de un aumento en la densidad mitocondrial contribuye a disminuir la distancia que el oxígeno recorre desde los capilares hasta ellas [19]. Si bien por conteo directo se ha encontrado un mayor número de mitocondrias en el miocardio del ganado vacuno de la altura [19], sin embargo empleando métodos planimétricos no se han hallado modificaciones en la relación entre el volumen ocupado por las mitocondrias y las miofibrillas del miocardio de animales expuestos a varias condiciones diferentes de hipoxia [9, 10, 13, 15, 20]. En cuanto al hígado, no existen estudios al respecto. En el presente trabajo se estudia el comportamiento de la masa mitocondrial cardíaca y hepática en ratas adaptadas a hipoxia hipobárica crónica, estimada por: *a*) la masa de proteína mitocondrial aislada por gramo de tejido; *b*) la relación entre la actividad de la citocromo oxidasa en el homogeneizado tisular y en las mitocondrias [21, 23], y *c*) la densidad mitocondrial numérica y volumétrica.

Material y métodos

Se utilizaron 11 ratas Wistar machos de un mes de edad, que fueron colocadas a una presión atmosférica de 440 mm Hg (equivalente a una altura de 4400 m) en una cámara de hipo-

---

Recibido: 13-XI-1980. Aceptado: 18-V-1981.

* Trabajo presentado en parte en la XXIII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, noviembre 1978.

** Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Dirección postal: Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Marcelo T. de Alvear 2270, 1122 Buenos Aires, Argentina.

presión durante 9 a 11 meses, e igual número de controles, que permanecieron a presión atmosférica normal. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las descriptas en un trabajo previo [7].

Las ratas se sacrificaron por decapitación, dentro de los 30 min de llevadas a presión atmosférica ambiental. Se extrajeron rápidamente el corazón (la masa ventricular) y el hígado, de los cuales se tomaron muestras para microscopía electrónica y luego se colocaron en medio de homogeneización frío: manitol 0.23 M, sacarosa 0.07 M, EDTA 1 mM y Tris-ClH 5 mM pH 7.4 (MSTE). Los órganos se secaron sobre papel de filtro y, después de separar la grasa y el tejido conectivo, se pesaron inmediatamente. Se cortaron en pequeños trozos, se lavaron con MSTE varias veces y se homogeneizaron. Los homogeneizados de corazón se llevaron a un volumen final de 50 ml y los de hígado a 100 ml, separándose de ambos alícuotas de 10 ml, que se congelaron. La concentración final fue de 6-12 mg de proteína mitocondrial/ml.

Las mitocondrias se prepararon a partir de 40 ml de los homogeneizados por el método de Schneider [22] y se suspendieron en MSTE en un volumen final de 2 ml las de corazón y 10 ml las de hígado. Las suspensiones mitocondriales se congelaron.

La actividad de la citocromo oxidasa en los homogeneizados se determinó dentro de las 24 h y en las mitocondrias dentro de las 48 h. La pérdida de actividad en este período se comprobó previamente que era despreciable. Cada rata hipóxica fue estudiada en forma simultánea con una rata control en todas las etapas del procedimiento. Antes de la determinación de la citocromo oxidasa, los homogeneizados se descongelaron y se homogeneizaron nuevamente. Se comprobó que la dilución en fosfato hipotónico y ruptura total en una licuadora Virtis no aumentaba la actividad hallada ni disminuía la dispersión de los resultados.

Determinación de proteínas. Las proteínas se determinaron por el método del biuret [11] en presencia de desoxicolato de sodio 0.1 %. Como referencia se utilizó una solución de albúmina de suero bovino (concentración: 10 mg/ml).

Determinación de la actividad de la citocromo oxidasa. La actividad de la citocromo oxidasa se determinó por el método espectrofotométrico de Yonetani y Ray [31], midiendo la velocidad de oxidación aeróbica del citocromo c reducido, catalizada por la citocromo oxidasa a 30° C. La reacción se inició mezclando rápidamente 5 a 15 μl de la muestra con la mezcla de reacción (3 ml) que contenía aproximadamente 10-20 μM de citocromo c reducido y fosfato 50 mM pH 7.0. La disminución de la absorbancia del citocromo c reducido a 550 nm en función del tiempo se registró con un espectrofotómetro Beckman D.U. Se hicieron por lo menos 3 determinaciones de cada muestra con distintas concentraciones de citocromo oxidasa. Las velocidades iniciales se calcularon por el método integral, determinando la constante de velocidad de primer orden a partir de la curva de absorción en función del tiempo [24]. El citocromo c reducido fue preparado por reducción del citocromo c (Sigma Chemical Co., type III) con ácido ascórbico y tetrametil-p-fenilendiamina, luego dializado hasta la eliminación de los reductores.

Microscopía electrónica. Para el estudio ultraestructural se tomaron pequeños trozos del lóbulo medio de hígado y de ventrículo izquierdo de corazón que fueron fijados en glutaraldehído al 3 % en solución reguladora de cacodilato de Na 0.1 M (pH 7.3); la postfijación se realizó con tetróxido de osmio al 1 %. Las muestras así fijadas fueron deshidratadas en soluciones de concentración creciente de etanol, óxido de propileno e incluidas en Epon 812. Secciones ultrafinas obtenidas con un ultramicrótomo Porter-Blum MT-1 se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron fotografiadas con un microscopio electrónico Siemens Elmiskop I A.

Planimetría. Para los estudios planimétricos de hígado se utilizaron 6 animales con hipoxia y 4 controles. Para corazón se estudiaron 4 animales hipóxicos y 3 controles. En ambos casos se estudiaron entre 2 y 4 muestras, obteniéndose entre 7 y 22 fotografías de cada muestra. Las microfotografías obtenidas al azar de campos citoplasmáticos, fueron tomadas con un aumento de 5000 x. La ampliación final para el estudio se realizó a 15 000 x en el caso del hígado y a 10 000 x para el corazón. Fueron estudiados, de acuerdo a las fórmulas matemáticas desarrolladas por Weibel y col. [30]: la densidad volumétrica (VvM), la densidad numérica (NMuv) y el volumen particular de las mitocondrias (VMI).

La evaluación estadística de los datos se realizó aplicando el test t de Student.

Resultados

La actividad específica de la citocromo oxidasa (Fig. 1) no mostró diferencias significativas en las preparaciones mitocondriales de hígado y corazón de las ratas hipóxicas y las controles. En los homogeneizados tisulares, en cambio, aumentó significativamente en el hígado de las hipóxicas, mientras que en el corazón permaneció normal.

La masa mitocondrial (Fig. 2), calculada como relación entre la actividad de la citocromo oxidasa en el homogeneizado y en las mitocondrias y expresada en mg de proteína mitocondrial por gramo de tejido, resultó significativamente mayor (40 %) en el hígado de las ratas hipóxicas, mientras que en el corazón no hubo diferencias significativas entre hipóxicas y controles. La estimación de la masa mito-

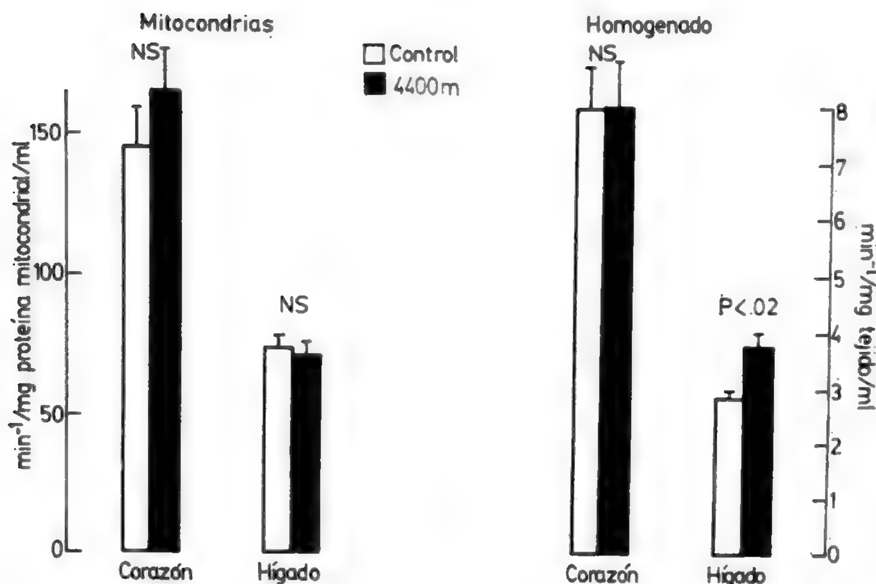


Fig. 1. — Actividad de citocromo oxidasa en ratas sometidas a hipoxia hipobárica crónica y en sus controles a nivel del mar.

condrial como los mg de proteína mitocondrial aislados por gramo de tejido utilizado, no reveló diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos tejidos, si bien en hígado se observó nuevamente un aumento del 10 %.

La microscopía electrónica de cortes de corazón (Fig. 3) no reveló diferencias cualitativas, de acuerdo a un criterio subjetivo, entre ratas hipóxicas y controles. En general, tampoco en hígado se observaron diferencias en la ultraestructura de ambos grupos, ya que las organelas subcelulares del grupo hipóxico presentaron aspecto normal. Sin embargo, en dos de las ratas hipóxicas se pudo observar, esporádicamente, áreas de rarefacción matricial en la zona 1 de Rapapport o la conformación de estructuras de tipo lamelar (Fig. 4).

Los resultados del estudio planimétrico (Tabla 1 y Fig. 2) mostraron que en el corazón la densidad mitocondrial volumétrica (VvM) —el volumen de la masa citosólica ocupada por las mitocondrias— no cambió. Por el contrario, la densidad mitocondrial numérica (NMuv) —el número de mitocondrias por unidad de volumen— aumentó significativamente, en un 18 %, en la hipoxia. El tamaño promedio (VMI) de las mitocondrias cardíacas en las ratas hipóxicas fue un 14 % menor

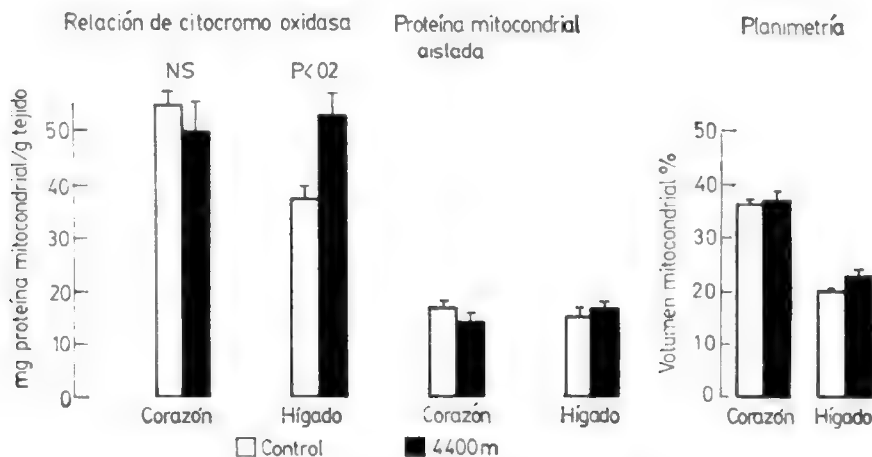


Fig. 2. — Masa mitocondrial cardíaca y hepática, determinada por tres procedimientos, en ratas sometidas a hipoxia hipobárica crónica y en sus controles a nivel del mar.

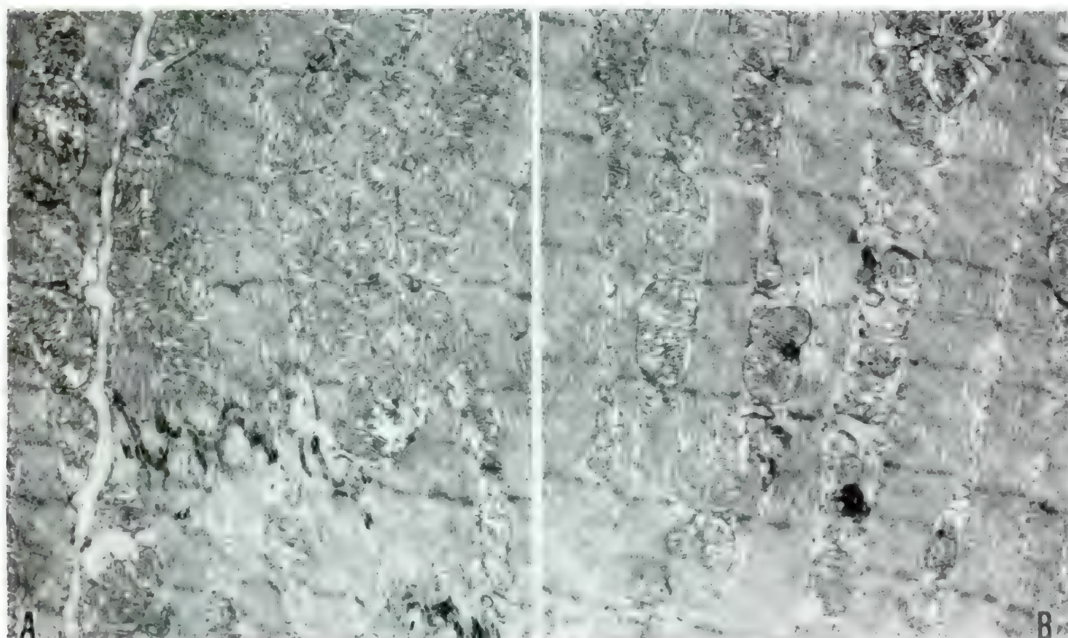


Fig. 3. — Miocardio del grupo control (**A**) y del sometido a hipoxia hipobárica crónica (**B**). Acetato de uranilo-citrato de plomo. 12 500 X.

que en las controles, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En el hígado se observó una tendencia al aumento en los valores de densidad mitocondrial volumétrica y numérica, pero las diferencias no fueron significativas. El tamaño promedio de las mitocondrias no cambió.

En resumen, la masa mitocondrial hepática aparece aumentada en un 40 %, 10 % ó 15 %, según sea determinada por los métodos de la citocromo oxidasa, de la proteína mitocondrial aislada o por planimetría, respectivamente.

Discusión

La ultraestructura normal hallada en el corazón de las ratas sometidas a 4400 m de altura simulada durante 9 a 11 meses concuerda con observaciones de otros autores en la misma especie y en condiciones de hipoxia moderada y crónica [5, 26, 27]. Han sido descriptas alteraciones ultraestructurales en miocardio de perros y conejos sometidos a 4300 m durante 5 meses; estas especies muestran ser menos resistentes que la rata [4]. En esta última especie sólo aparecen cambios cuando las

Tabla 1. — *Determinaciones planimétricas de mitocondrias en ratas sometidas a hipoxia hipobárica crónica y en sus controles a nivel del mar* *

		VvM	NMuv	VMI
Corazón	Control	36.3 ± 1.0	106.6 ± 5.6	0.34 ± 0.03
	Hipoxia	37.2 ± 1.6	126.3 ± 4.4 $p < 0.05$	0.29 ± 0.01
Hígado	Control	20.0 ± 0.6	31.4 ± 1.3	0.64 ± 0.04
	Hipoxia	23.0 ± 1.1	34.2 ± 2.2	0.68 ± 0.04

* Los resultados se expresan como $\overline{X} \pm$ ES. VvM: Densidad mitocondrial volumétrica; NMuv: Densidad mitocondrial numérica; VMI: Tamaño promedio de mitocondrias.

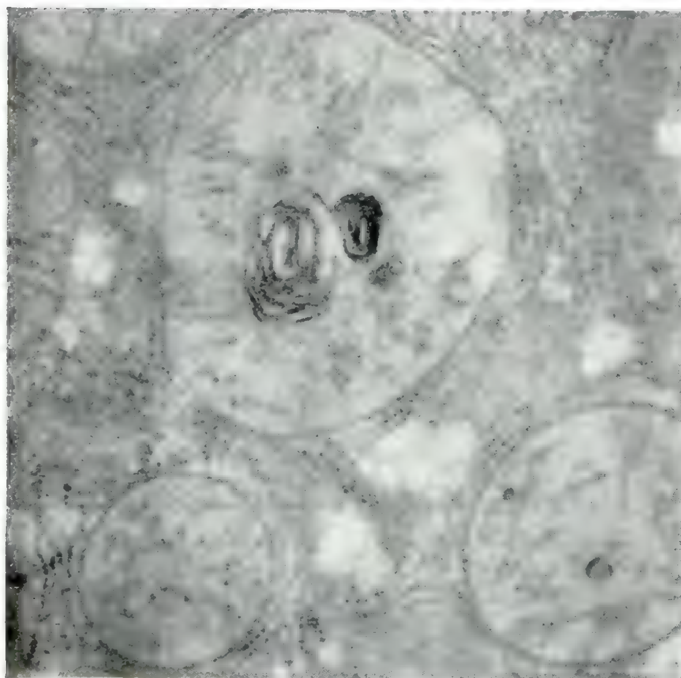


Fig. 4. — Figuras lamelares y rarefacción matricial observada ocasionalmente en mitocondrias de hepatocitos de dos ratas sometidas a hipoxia hipobárica crónica. Acetato de uranilo-citrato de plomo. 23 000 X.

condiciones de hipoxia son mucho más severas [9, 26]. La ultraestructura hepática normal, pero con la presencia aislada de mitocondrias con rarefacción matricial y la conformación de estructuras de tipo lamelar, concuerda con la observación de que el tejido hepático es menos resistente a la hipoxia que el miocardio [26].

La ausencia de diferencias significativas en la masa mitocondrial miocárdica determinada por los tres procedimientos –relación de citocromo oxidasa, proteína mitocondrial aislada y planimetría– concuerda con los resultados de varios autores que, empleando exclusivamente métodos planimétricos, no hallaron cambios en el área relativa ocupada por las mitocondrias [9, 10, 13, 15, 20]. En lo que respecta al número de mitocondrias en el miocardio, nuestras observaciones mostrando un aumento concuerdan con las de Ou y Tenney [19] en ganado vacuno de la altura. Otros autores no observaron este hecho, lo que podría atribuirse a diferencias de especies [15] y/o a la brevedad del período de exposición a la hipoxia [9, 13, 20]. Si bien la disminución en el volumen particular de las mitocondrias no resultó estadísticamente significativa, la similitud en la masa mitocondrial con los controles sugiere que el aumento en la densidad numérica efectivamente va acompañado por una disminución del tamaño medio de las mitocondrias. Los tres procedimientos empleados para determinar la masa mitocondrial revelaron un aumento de la misma en el hígado de los animales hipóxicos. El hecho de que sólo las diferencias halladas por el método de la citocromo oxidasa resultaron estadísticamente significativas se explicaría por la mayor exactitud y confiabilidad de este método. La determinación de la proteína mitocondrial aislada sólo es de carácter estimativo, ya que sólo se aisla aproximadamente el 40 % de la proteína mitocondrial hepática (Fig. 2) y además, las mitocondrias obtenidas están contaminadas con peroxisomas y lisosomas. Respecto a las determinaciones planimétricas, la microheterogeneidad del hígado es un factor de dispersión de los resultados, que limita la significación estadís-

tica, ya que el lobulillo hepático presenta tres zonas con variaciones bastante marcadas en la densidad mitocondrial volumétrica y numérica [18]. La diferencia entre los porcentajes de aumento en la masa mitocondrial encontrados por los métodos de la proteína mitocondrial aislada y de la relación de citocromo oxidasa podría indicar un cambio en las características de sedimentación o de fragilidad de las mitocondrias hepáticas en la hipoxia, ya que el porcentaje de recuperación de la proteína mitocondrial sería 20 % menor. Además, el cociente entre la masa mitocondrial calculada por la relación de citocromo oxidasa y el valor volumétrico obtenido por planimetría, indicaría que la densidad de las mitocondrias es 22 % mayor en la hipoxia. Aun cuando estas diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas, abren la posibilidad de que esté aumentada la fracción de mitocondrias pesadas, que quedarían atrapadas con los núcleos y restos celulares durante el proceso de fraccionamiento por centrifugación diferencial.

Los valores normales de actividad específica de citocromo oxidasa encontrado en las mitocondrias de hígado y corazón de ratas sometidas a hipoxia crónica en el presente estudio indican, como otros parámetros previamente determinados [6, 8], que no hay aumento en la eficiencia respiratoria de las mismas. El incremento en la actividad de la citocromo oxidasa en los homogeneizados de hígado debe pues atribuirse al aumento de la masa mitocondrial inducida por la hipoxia en este tejido. Los estudios publicados sobre la actividad de la citocromo oxidasa en la hipoxia son contradictorios. Algunos autores no han encontrado cambios [1, 2, 13, 17, 28, 29], otros un aumento [3, 19] y otros, una disminución [12]. Si bien un aumento en la actividad de la citocromo oxidasa mitocondrial como mecanismo de adaptación a la hipoxia es cuestionable debido a la elevada afinidad de esta enzima por el oxígeno, es posible que las discrepancias se deban al uso de condiciones experimentales, especies, órganos y métodos diferentes.

En conclusión, los resultados de este estudio muestran que en las ratas adaptadas a la hipoxia aumenta la masa mitocondrial en el hígado, mientras que en el miocardio aumenta el número de mitocondrias, sin variación de la masa. El aumento de la masa mitocondrial hepática llevaría a un incremento de la capacidad oxidativa tisular; por su parte, el aumento en la densidad numérica mitocondrial aumentaría la posibilidad de una molécula de oxígeno de encontrar un sitio enzimático en poco tiempo y tendría así el efecto de aumentar el coeficiente de difusión intracelular del oxígeno [19].

Resumen

Se estudió la masa mitocondrial en hígado y miocardio de ratas sometidas a 440 mm Hg (4400 m de altura simulada) durante 9 a 11 meses y en sus controles a presión atmosférica normal. La determinación se realizó por tres procedimientos: a) *por la evaluación de la masa de proteína mitocondrial aislada por gramo de tejido;* b) *por la relación entre la actividad de la citocromo oxidasa en el homogeneizado total del tejido y en las mitocondrias aisladas del mismo, y* c) *por evaluación de la densidad mitocondrial numérica y volumétrica en tejidos fijados y analizados por microscopía electrónica mediante planimetría. Los tres métodos mostraron un aumento de la masa mitocondrial en hígado aunque sólo con el de la relación de citocromo oxidasa resultó estadísticamente significativo. En miocardio la masa mitocondrial permaneció normal en las ratas hipóxicas, pero se encontró un aumento estadísticamente significativo de la densidad numérica. Los cambios hallados aumentarían la capacidad oxidativa tisular favoreciendo la llegada del oxígeno a las mitocondrias. Por otra parte, la ausencia de diferencias significativas en la actividad de la citocromo oxidasa en las mitocondrias de ratas hipóxicas y controles, en ambos tejidos, indicaría que la eficiencia respiratoria de las mitocondrias no cambia en la adaptación a la hipoxia.*

Summary

MITOCHONDRIAL MASS OF CARDIAC AND HEPATIC TISSUE IN CHRONIC HYPOBARIC HYPOXIA.

As mitochondria account for the bulk of oxygen consumed by the body, it has been suggested that an increase in their number, by decreasing the mean free path from the capillaries, would be an effective mechanism of adaptation to hypoxia. Data reported in the literature on this subject are scanty and somewhat contradictory. The present study was undertaken to investigate the behavior of mitochondrial mass in cardiac and hepatic tissue of rats adapted to hypobaric hypoxia. Eleven rats were submitted to 440 mm Hg (4400 m simulated altitude) in a hypopressure chamber, for 9 to 11 months and the same number of animals remained as controls at sea level atmospheric pressure. Mitochondrial mass in cardiac and hepatic tissue of rats sacrificed by decapitation was determined by three methods: a) *by evaluation of mitochondrial protein mass isolated per gram of tissue;* b) *by the ratio between cytochrome oxidase activity in tissue homogenate and in isolated mitochondria, and* c) *by evaluation of mitochondrial number and volume density in fixed tissues analyzed by electron microscopy using a stereologic technique. Cytochrome oxidase activity (Fig. 1), determined by the spectrophotometric method of Yonetani and Ray, was not significantly changed either in cardiac and hepatic mitochondria or in cardiac homogenate, whereas hepatic homogenate showed an increase ($p < 0.02$). Mitochondrial mass (Fig. 2) in hepatic tissue increased 10 % by the method of isolated mitochondrial protein, 40 % by that of cytochrome oxidase ratio and 15 % by the evaluation of mitochondrial volume density, although only in the second one, probably the most reliable, was the difference statistically significant ($p < 0.02$) Mitochondrial mass in myocardial tissue did not change. Electron microscopy showed the absence of qualitative differences either in heart (Fig. 3) or in liver, except for some subtle mitochondrial alterations in the latter, which were only found in two of the hypoxic rats (Fig. 4). Furthermore, the stereologic study (Table 1) showed an increase in mitochondrial density in the heart ($p < 0.05$), while mitochondrial mean size tended to decrease. In liver, although the differences were not statistically significant, the increase in mitochondrial volume density was accompanied by a similar increase in number density, mean size remaining unchanged. Results led to the conclusion that in the liver of rats adapted to hypobaric hypoxia there is an increase in mitochondrial mass, which would increase tissue oxidative capacity. In turn, myocardial tissue failed to show any change in mitochondrial mass, but there is an increase in quantity, which would increase the probability of an oxygen molecule finding an enzyme site in a short time and would thus have an apparent effect of increasing intracellular "diffusion capacity". On the other hand, the absence of significant differences in cardiac and hepatic mitochondrial cytochrome oxidase activity goes against the hypothesis that efficiency of the respiratory chain increases in adaptation to hypoxia.*

Bibliografía

1. Aithal HN, Ramasarma T: Activation of liver succinate dehydrogenase in rats exposed to hypobaric conditions. *Biochem J* 115: 77, 1969.
2. Albaum HG, Chinn HI: Brain metabolism during acclimatization to high altitude. *Am J Physiol* 174: 141, 1953.
3. Barbashova ZI, Ginetsinsky AG: Tolerance to cyanide poisoning in animals acclimatized to altitude. *Tr Fiziol Inst Akad Nauk SSSR* 1: 103, 1945.
4. Bischoff MB, Dean WD, Bucci TJ, Frics LA: Ultrastructural changes in myocardium of animals after five months residence at 14 110 feet. *Fed Proc* 28: 1268, 1969.
5. Bowers WD, Burlington RF, Whitten BK, Daum RC, Posiviata MA: Ultrastructural and metabolic alterations in myocardium from altitude-acclimated rats. *Am J Physiol* 220: 1885, 1971.
6. Costa LE, Boveris A, Taquini AC: Características de la actividad respiratoria mitocondrial en la hipoxia hipobárica crónica. *Medicina (Bs Aires)* 37: 460, 1977.
7. Costa LE, Martin IH, Macome JC, Taquini AC: Efecto de la hipoxia hipobárica crónica sobre el crecimiento y la composición corporal en la rata. *Medicina (Bs Aires)* 39: 604, 1979.

8. Costa LE, Taquini AC: Effect of chronic hypoxia on myoglobin, cytochromes and ubiquinone levels in the rat. *Acta Physiol Latinoam* 20: 103, 1970.
9. Eriskovskaya NK, Tsellarius YG: Cytological changes in the myocardium of rats adapted to high altitude hypoxia. *Bull Exp Biol Med* 82: 1727, 1976.
10. Friedman I, Moravec J, Reichart E, Hatt PY: Subacute myocardial hypoxia in rat. An electron microscopic study of the left ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 5: 125, 1973.
11. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum proteins by means of the biuret. *J Biol Chem* 177: 751, 1949.
12. Hakami N, Pious DA: Regulation of cytochrome oxidase in human cells in culture. *Nature* 216: 1087, 1967.
13. Herbener GH, Swigart RH, Lang CA: Morphometric comparison of the mitochondrial populations of normal and hypertrophic hearts. *Lab Invest* 28: 96, 1973.
14. Hurtado A: Animals in high altitude: resident man. Handbook of Physiology, Section 4: "Adaptation to the Environment". American Physiological Society. Washington DC, p 843, 1964.
15. Kearney MS: Ultrastructural changes in the heart at high altitude. *Path Microbiol* 39: 258, 1973.
16. Kinnula V: Enzyme activities of liver mitochondria from altitude exposed rats. *Acta Physiol Scand* 91: 12 A, 1974.
17. Kinnula V: Rat liver mitochondrial enzyme activities in hypoxia. *Acta Physiol Scand* 95: 54, 1975.
18. Loud AV: A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* 37: 27, 1968.
19. Ou LC, Tenney SM: Properties of mitochondria from hearts of cattle acclimatized to high altitude. *Resp Physiol* 8: 151, 1970.
20. Pelosi G, Agliati G: The heart muscle in functional overload and hypoxia: A biochemical and ultrastructural study. *Lab Invest* 18: 86, 1968.
21. Scarpa A, Graziotti P: Mechanisms for intracellular calcium regulation in heart. *J Gen Physiol* 62: 756, 1973.
22. Schneider WC: Intracellular distribution of enzymes. III. The oxidation of octanoic acid by rat liver fractions. *J Biol Chem* 176: 259, 1948.
23. Schollmeyer P, Klingenberg M: Über den cytochrom-gehalt tierischer gewebe. *Biochem Z* 335: 426, 1962.
24. Smith L: Cytochromes a, a_1, a_2 and a_3. *Methods in Enzymology*. Ed. SP Colowick, NO Kaplan. *Academic Press*, Vol II, p 732, 1955.
25. Stere AJ, Anthony A: Myocardial Feulgen DNA levels and capillary vascularization in hypoxia-exposed rats. *J Appl Physiol: Respirat Environ Exercise Physiol* 42: 501, 1977.
26. Sulkin NM, Sulkin DF: An electron microscopic study of the effects of chronic hypoxia on cardiac muscle, hepatic and autonomic ganglion cells. *Lab Invest* 14: 1523, 1965.
27. Sulkin NM, Sulkin DF: Age differences in response to chronic hypoxia on the fine structure of cardiac muscle and autonomic ganglion cells. *J Gerontol* 22: 485, 1967.
28. Susheela L, Ramasarma T: Modulation of succinate dehydrogenase in response to environmental stress conditions of hypobaria and hypoxia. *Biochim Biophys Acta* 321: 423, 1973.
29. Tappan DV, Reynafarje B, Potter VR, Hurtado A: Alterations in enzymes and metabolites resulting from adaptation to low oxygen tensions. *Am J Physiol* 190: 93, 1957.
30. Weibel ER, Staübli W, Gnägi HR, Hess FA: Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol* 42: 68, 1969.
31. Yonetani T, Ray GS: Studies on cytochrome oxidase. VI. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome c by cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 240: 3392, 1965.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 573-578 (1981)

INTERFERON EN LA INFECCION EXPERIMENTAL CON VIRUS JUNIN

ANGELICA R. TEYSSIE *, L. M. KNECHER, BETHY L. AYERRA DE HOLSTEIN

Departamento de Virus. Instituto Nacional de Microbiología Carlos G. Malbrán, Buenos Aires

En el curso de nuestras investigaciones sobre virus Junin, agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) e interferón (IFN), hemos establecido que este virus induce bajos niveles de IFN ratón (IFNr) in vitro, aunque pudieron observarse diferencias de magnitud, correspondiente a una mayor inducción con las cepas menos patogénicas para cobayo e, inversamente, menor capacidad inductora de la cepa más patogénica ensayada [21]. La sensibilidad in vitro fue demostrada por aplicación de la técnica de inmunofluorescencia indirecta a cultivo de fibroblastos humanos y de línea L de ratón infectados y tratados con IFN homólogo. En el presente trabajo consideramos de interés estudiar la sensibilidad in vivo. Se presentan datos relativos a la influencia del tratamiento con IFNr sobre la sobrevida de los animales infectados con dos cepas distintas de virus Junin, como respuesta final, y algunos parámetros parciales tales como: multiplicación intracerebral del virus, nivel de IFNr circulante e influencia sobre la respuesta inmune específica a través del estudio de niveles de anticuerpos fijadores de complemento.

Material y métodos

Virus:

Junín: Cepa $XJCl_3$, atenuada para cobayo. Título: $10^{5.5}$ DL_{50}/0.02 ml vía intracerebral (ic) en ratones recién nacidos (rrn) y 10^6 $DICT_{50}$/0.025 por microtécnica en cultivos de células Vero [20]. Cepa MC_2, de virulencia intermedia. Origen cricétido adaptada a ratón. Tercer pasaje icrrn. Título: 1 x $10^{6.5}$/0.02 ml icrrn y 10^7/0.025 $DICT_{50}$ por microtécnica como se indica anteriormente

NVD: Virus de la enfermedad de Newcastle, cepa Hertfordshire, obtenida del laboratorio del Dr Ch Chany y mantenida por pasajes en embrión de pollo. Título: 1024 unidades hemaglutinantes por ml. (UHA/ml) y 2.2 x 10^8 unidades formadoras de placas (UFP) en fibroblastos de pollo.

VSV: Virus de estomatitis vesicular, cepa Indiana, mantenido por pasajes en células Vero. Título de los lotes utilizados: 10^7 y 10^8 $DICT_{50}$/ml.

Animales: Ratones Swiss población entre 48 y 72 h de vida.

Cultivos celulares:

Línea L: Células de origen ratón. Se utilizaron monocapas confluentes de 48 h de desarrollo, para titulación de IFNr. Densidad inicial 5 x 10^5 cél/ml.

Línea LM: Sublínea de células L, altamente productora de IFN. Obtenida del laboratorio del Dr Ch Chany (Hospital Saint Vicent Paul, París). Se utilizaron monocapas confluentes de 48 h de desarrollo, para producción de IFNr. Densidad inicial 5 x 10^5 cel/ml. Medio de crecimiento: Me-

— — — —

Recibido: 29-IV-1981. Aceptado: 17-VI-1981.

* Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Dirección postal: Departamento de Virus, Instituto Nacional de Microbiología Carlos G. Malbrán, Av. Vélez Sársfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina.

dio 199 (GIBCO) suplementado con 10 % suero de ternera inactivado (STI). Medio de mantenimiento: Medio 199 (GIBCO) suplementado con 2 % STI.

Línea Vero: Células de mono verde. Se utilizaron suspensiones de 250 000 cél/ml para efectuar la técnica de microplaca para titulación de virus Junin. Todas las líneas se trabajaron con los mismos medios de crecimiento y mantenimiento.

Interferón ratón (IFNr): Producción: sobre células L_M con NDV como inductor y semipurificado según técnica ya descripta [11]. Titulación: por técnica de microplacas sobre células L con VSV como revelador. Adaptación de la técnica de Dahl y Degré [6].

Título: 4000 U/ml: Determinación de proteínas de los lotes por método de Lowry. Contenido proteico: 0.1 mg/ml. Actividad específica:

$$\frac{\text{Unidades IFN}}{\text{mg proteínas}} = \frac{4000\ \text{U/ml}}{0.10\ \text{mg/ml}}\ 40\,000\ \text{U/mg}$$

Marcha de los experimentos:

Se reunieron todos los ratones recién nacidos en un solo lote, para dividirlos posteriormente en cajas conteniendo 8 animales por cada madre. Estas se agrupan en 4 series:

A) controles sanos; B) infectados con virus Junin (se indica la cepa en cada caso); C) infectados y tratados con IFNr, y D) controles de IFNr.

Se destinan 3 cajas para cada serie: 2 de ellas para seguimiento de sobrevida y una caja para la determinación de los parámetros inmunovirológicos parciales. Se efectúan 3 experimentos en total.

Esquema de infección (series B y C): Se inocula virus Junin por vía ic ($XJCl_3$ o MC_2) con 10, 50 y 100 DL_{50} para elegir dosis de trabajo.

Esquema de tratamiento con IFNr (series C y D): Se efectuó un estudio previo sobre dosis-respuesta que nos llevó a elegir 10 000 U por inoculación contenida en 0.1 ml. En la serie C, la inoculación de IFNr comienza a partir de las 6 h post-infección (pi) vía sc/im, frecuencia indicada en plan 1 o plan 2.

Plan 1: 4 dosis de 10 000 U IFNr; 1ª a las 6 h pi; 3 dosis sucesivas cada 24 horas.

Plan 2: 5 dosis de 10 000 U IFNr; las 4 primeras como en plan 1 y la 5ª dosis a los 11 días pi. El plan 2 incluye una dosis a los 11 días pi para determinar la acción del interferón exógeno en el comienzo de la aparición de los síntomas clínicos.

La serie D recibe las dosis de IFNr de acuerdo con el plan 1 o 2 si ninfección previa.

Resultados

a) *Sobrevida:*

Se realizaron ensayos preliminares de sobrevida infectando los rrn con 10, 50 y 100 DL_{50}, para adecuar nuestro modelo in vivo a condiciones en las que fuera dable observar una respuesta frente al inhibidor.

Dada la alta sobrevida observada en los lotes inoculados con 10 DL_{50} y al 100 % de muertes observada en los que recibieron 100 DL_{50}, se eligió como dosis de trabajo 50 DL_{50} de virus.

El tratamiento con IFNr siguiendo el plan 1, a rrn inoculados con 50 DL_{50} de virus Junin cepa $XJCl_3$, permite observar una protección sobre la infección respecto

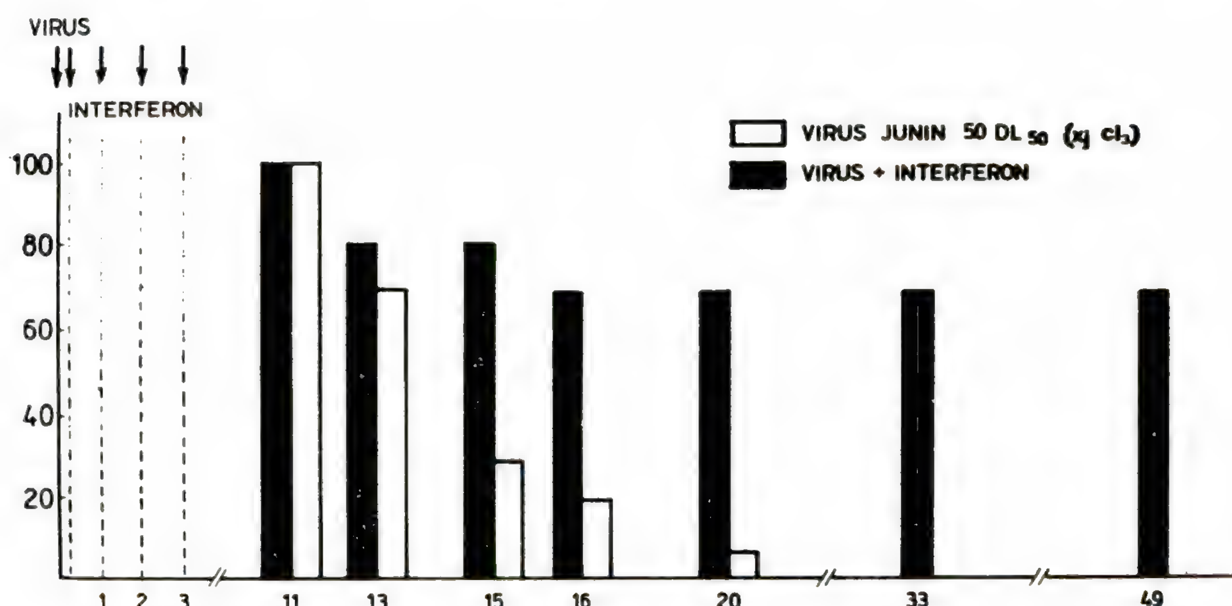


Fig. 1. — Porcentaje de sobrevida de rrn inoculados por vía ic con 50 DL_{50} de virus Junin (cepa $XJCl_3$) en comparación con rrn tratados pi con IFNr en 4 dosis diarias sucesivas a partir de la hora 6 pi.

a los controles infectados solamente. Esta protección se traduce en los más altos niveles de sobrevida (66 %) y se logra por la aplicación de 10 000 U IFNr por dosis y 40 000 UIFNr como dosis total (Fig. 1).

Con la cepa MC_2 los niveles de sobrevida registrados alcanzan al 18.75 % con el esquema 1 (40 000 U/IFNr total) y un valor del 25 % con el esquema 2 que totaliza 50 000 U/IFNr.

Con ambos sistemas resultó importante el comienzo temprano del tratamiento pi. ya que en experimentos previos, fueron ensayados varios esquemas de iniciación de tratamiento (6, 12, 24 h pi), habiéndose obtenido los porcentajes más altos de sobrevida con el correspondiente a 6 h.

Datos comparativos de sobrevida de las dos cepas virales ensayadas se presentan en la Tabla 1. En ambas series de experimentos, los sobrevivientes presentaron un discreto estado de hiperexcitabilidad, no observando diferencia de peso con los controles sanos.

Los lotes control de IFNr tampoco evidenciaron diferencias significativas de peso en relación a los mismos controles, por lo que podemos establecer que en nuestras condiciones experimentales, las inoculaciones de IFNr no resultaron *per se* un factor de agresión para los animales.

b) *Multiplicación viral:*

La diferencia de títulos virales en cerebros de animales infectados y los tratados con IFNr es de 1 log para la cepa $XJCl_3$ y alcanza 1.5 log para la cepa MC_2. La titulación se realizó en lotes paralelos de 8 ratones cada uno, sacrificado al 8º día (Tabla 2). Estos resultados son promedio de tres experimentos.

TABLA 2. — *Título de virus Junin en cerebro de ratones al 8º día post-infección intra-cerebral*

Cepa	Tratamiento	Título	
$XJCl_3$	—	4×10^5	DCT_{50}/ml
	IFN	4×10^4	,, ,,
MC_2	—	$4 \times 10^{5.5}$	,, ,,
	IFN	4×10^4	,, ,,

c) *IFNr circulante:*

El análisis de la actividad IFNr en sueros se realiza también al 8º día pi y sobre los mismos animales en los que se titula virus en cerebro; no fue posible obtener datos anteriores al 8º día por dificultades inherentes a la edad de los animales.

En los lotes pertenecientes a la serie B (control virus), infectada con $XJCl_3$ se detecta un nivel de IFN circulante de 10 U/ml; en cambio en la serie C que recibió tratamiento con IFNr este nivel alcanza a 40 U/ml.

En los controles interferón (serie D) no se detectó actividad interferente.

d) *Anticuerpos fijadores de complemento para virus Junin:*

Los resultados de fijación de complemento fueron obtenidos para confirmar la existencia de multiplicación viral en los

TABLA 1. — *Acción de interferón in vivo*

Cepa	Infección y tratamiento	Días post-infección				% sobrevida al día 35
		13	17	21	35	
	50 DCT_{50}	10/14	2/14	0/14	0/14	0
$XJCl_3$	50 DCT_{50} IFNr.esq.1.	10/12	8/12	8/12	8/12	65
	50 DCT_{50}	12/16	4/16	1/16	1/16	6,25
MC_2	50 DCT_{50} IFNr.esq.1.	10/16	3/16	3/16	3/16	18,75
	50 DCT_{50} IFNr.esq.2.	12/16	6/16	4/16	4/16	25

* Sobrevivientes sobre total inoculado. Resultado promedio de 2 experimentos.

animales sobrevivientes. Se estudió su nivel en animales sobrevivientes de lotes infectados con las cepas $XJCl_3$ y MC_2 y lotes de animales tratados con IFNr pi, siguiendo el plan 1 y 2 de inoculación.

En los correspondientes a la infección con $XJCl_3$ tratados con IFNr plan 1, se registraron títulos de 1 : 16 al 49º día pi, no pudiendo comparar valores con los controles infectados, ya que en esa serie no hubo sobrevivientes en el mismo período.

Los experimentos con la cepa MC_2 corresponden a dos esquemas distintos de inoculación de IFNr (planes 1 y 2). Con el plan 1, se obtuvo un valor de 1 : 1024; con el plan 2, 1 : 512 con un valor de 1 : 4 en los controles infectados en ambas series; estos resultados fueron obtenidos a los 35 días pi.

Discusión

La influencia del mecanismo IFN en la recuperación de enfermedades virales ha sido objeto de estudio en numerosos modelos experimentales animales e incluso en el hombre. En algunos procesos se ha demostrado su positiva acción antiviral y en otros su actividad se expresa como inmunomodulador [1, 8, 13, 17]. En nuestro modelo experimental rrn, infectado con virus Junin por vía ic el tratamiento con IFN exógeno nos permitió observar: *a)* efectos positivos sobre la sobrevida de los animales tratados; *b)* reducción del título de virus en cerebro; *c)* aumento del nivel de interferón circulante, y *d)* modificación del nivel de anticuerpos FCo. En general, los resultados obtenidos apoyan la idea de que en determinadas condiciones experimentales existe una relación causal entre la administración de IFN exógeno y la protección frente a la infección. Algunos investigadores han descripto resultados positivos por aplicación de IFN exógeno en forma profiláctica, otros consideran que puede lograrse una acción terapéutica mientras existan células sensibles sin infectar, en el organismo [14]. En el modelo utilizado en el presente trabajo, el tratamiento comienza *a posteriori* de una infección vía ic. Como se observó en los sistemas estudiados, los porcentajes más altos de sobrevida corresponden con el comienzo temprano (6 h), e intervalos de 24 h en la aplicación de las dosis establecidas de IFN, por lo que, las determinantes importantes son: dosis utilizada, momento de comienzo del tratamiento y ritmo de inoculación durante el mismo.

El IFN exógeno administrado por vía parenteral puede llegar al SNC vía capilares sanguíneos [2], y allí actuar directamente o a través de los receptores de membrana que permiten la amplificación del mecanismo [5]. La limitación de la multiplicación del virus en cerebro de los grupos tratados con IFN exógeno, sería la expresión inmediata de la protección. El IFN actuaría como antiviral, demostrándose la sensibilidad del virus Junin al inhibidor in vivo, como ya había sido observado in vitro [21]. Una reducción del título viral también fue observada en cerebro de ratones infectados con virus de Linfochoriomeningitis (LCM), a los que se transfirió linfocitos T citotóxicos, relacionados con la producción de IFN [3].

Si bien se confirma in vivo que el virus Junin es un inductor pobre de IFN, como lo señalaban los datos obtenidos in vitro, el bajo nivel de IFN circulante detectado en los animales infectados (10 μ/ml) resulta potenciado en los grupos tratados con IFN exógeno (40 μ/ml). Por lo tanto, no siendo suficiente para controlar la infección, la baja respuesta IFN, al virus Junin infectante, la mayor defensa observada en los grupos tratados, podría atribuirse a una potenciación en su inducción provocada por el IFN exógeno. Este fenómeno sería comparable al efecto *priming* que para virus Junin fue demostrado en un trabajo anterior [11]. El resultado de la potenciación en relación a la enfermedad, es coherente con el claro significado biológico que se atribuye a una activación rápida del sistema IFN con producción local in vivo, traducida *a posteriori* en IFN circulante [7].

La ausencia de actividad interferente en suero de controles IFN es acorde con el rápido *clearance* de la molécula IFN comunicado por otros autores [2]. Este comportamiento permite descartar que el nivel de 40 U/ml de IFN circulante hallado al 8º día pi pueda provenir del IFN inoculado durante el tratamiento, ya que el mismo finalizó a las 72 h pi.

Los resultados obtenidos con IFN exógeno, concuerdan con los de otros modelos experimentales en los que, el interferón endógeno inducido es un factor preponderante en la defensa. Entre ellos, podemos citar: el paralelismo entre IFN circulante y sobrevida observada en ratones atímicos infectados con virus de LCM [15] y la protección observada frente a la infección con virus Junin, por infección previa con virus Tacaribe atribuida, al menos parcialmente, a la producción de IFN endógeno [12].

En cuanto a la variación en los niveles de anticuerpos FCo, se han observado diferencias en ellos, en relación a la cepa viral utilizada, lo que sería coincidente con lo descripto para el virus LCM en experimentos de transferencia de linfocitos de animales inmunes [4]. Si bien los anticuerpos FCo anti-Junin, pueden no tener valor como defensa frente a la infección viral, como se considera para LCM [4], su detección es un parámetro de presencia del determinante antigénico viral en los sobrevivientes [19].

Aunque se describen efectos supresores de IFN sobre la producción de anticuerpos contra distintos antígenos [13], también han podido demostrarse efectos potenciadores particularmente en ratones recién nacidos [22]. Podría aceptarse que los altos títulos de anticuerpos FCo, observados con la cepa MC_2 en ratones recién nacidos, fueran consecuencia de la característica de inmunomodulador del IFN [10]. La potenciación observada podría deberse a un efecto directo sobre linfocitos B [9] o a una acción indirecta sobre células T [8]. En una enfermedad como Fiebre Hemorrágica Argentina, en que la respuesta inmune puede ser un desencadenante de patología [16], y considerando que el IFN, producido por células de la respuesta inmune, ejerce su acción sobre ellas, la interacción virus Junin IFN deberá ser analizada con más detalle. Nuestros datos, que consideramos sugerentes, permiten formular nuevas hipótesis de trabajo.

Resumen

En este trabajo se evalúa la sensibilidad in vivo de 2 cepas de virus Junin estudiando la influencia del tratamiento con IFN homólogo sobre ratones previamente infectados. En nuestro modelo experimental: ratón recién nacido infectado por vía intracerebral con virus Junin (cepa $XJCl_3$ o MC_2), la aplicación por vía sc/im de 4 dosis de 10 000 U/IFN permitió observar:

1) Niveles de sobrevida del 66 % frente a 50 DL_{50} de cepa $XJCl_3$; y de 18.75 % frente a MC_2; valor que se incrementa al 25 % por aplicación de una 5ª dosis de IFN al día 11 pi. 2) Reducción del título de virus en cerebro al 8º día pi con valores de 1 a 1.5 log (cepa $XJCl_3$ o MC_2), respectivamente. 3) Aumento del nivel de IFN circulante, probablemente por efecto priming. *4) Modificación del nivel de anticuerpos fijadores de complemento específicos. Estos resultados sugieren que el virus Junin es sensible al interferón exógeno in vivo. Se discute el papel de antiviral e inmunomodulador del IFN que puede contribuir a las observaciones obtenidas.*

Summary

EFFECT OF INTERFERON ON EXPERIMENTAL JUNIN VIRUS INFECTION.

Virus behaviour concerning interferon mechanism is related, both to the production and to the sensitivity to the inhibitor. Junin virus is a poor interferon inductor and relatively sensitive to its action in vitro. In this paper the in vivo sensitivity of 2 strains of Junin virus is evaluated studying the action of homologous interferon injected to previously infected mice. In our experimental model using suckling mice intracerebrally infected with Junin virus (strain $XJCl_3$ or MC_2), followed by the subcutaneous or intramuscular treatment with 4 interferon doses (10 000 U/IFN each), it was possible to observe: 1) 66 % survival against intracerebral challenge with 50 LD_{50} of strain $XJCl_3$ (Fig 1); 18.75 % survival, against the same dose of strain MC_2, survival value that increased to 25 % after the administration of a 5th interferon dose on the 11th day pi (Table 1). The survival depended on the schedule of interferon treatment, being very important its early beginning pi. 2) Reduced virus titer in brain, estimated by micro-

method in Vero cells, showed on the 8th day pi, values within 1-1.5 log (strain $XJCl_3$ or MC_2 respectively, Table 2); this reduction could be attributed to the antiviral activity of the exogenous interferon, spreading via the capillary vessels to its target in the CNS and amplifying its mechanism through membrane receptors. 3) Higher level of circulating interferon on the 8th day pi, possibly through a priming effect similar to the one previously observed by us in vitro. 4) Presence of specific complement fixation antibodies in survival mice, corroborating the presence of the antigenic determinant; and modification of its level depending on the virus strain, as observed with Lymphochoriomeningitis virus, in lymphocyte transfer experiments. We consider that these last observations are connected with the immunoregulatory activities of interferon, and are worthy of further investigation in this disease, where the immune response is related to pathogenesis. These results suggest that Junin virus is sensitive to exogenous interferon in vivo.

Agradecimientos: Este trabajo fue parcialmente apoyado por subsidio de la Secretaría de Ciencia y Técnica (SECYT) y la Fundación Emilio Ocampo. Se agradece la valiosa asistencia técnica de las Srtas. Mónica Isabel Tous y Ana Teresa Giraudo y del Sr. L. Silvano López.

Bibliografía

1. Baron S, Dianzani F: General considerations on the interferon system. *Texas Reports on Biology and Medicine* 35: 1, 1977.
2. Bocci V: Distribution of interferon in body fluids and tissues. *Texas Reports of Biology and Medicine* 35: 436, 1977.
3. Br-Jorgensen K: The interplay between Lymphochoriomeningitis virus immune function and hemopoiesis in mice. *Adv Virus Res* 22: 327, 1978.
4. Cole G, Nathanson N: Lymphocytic Choriomeningitis. Pathogenesis. *Progr med Virol* 18: 94, 1974.
5. Chany C, Pauloin A, Chany-Fournier F: Role of the membrane bound receptor system in the biological activity of interferon. *Texas Reports on Biology and Medicine* 35: 330, 1977.
6. Dahl H, Degré MA: Micro Assay for mouse and human interferon. *Acta Path Microbiol Scand* Section B 80: 863, 1972.
7. Dianzani F, Gullino P, Baron S: Rapid activation of the interferon system in vivo. *Infection and immunity* 20: 55, 1978.
8. Galasso GJ, Dunnik JK: Interferon and antiviral drug for use in man. *Texas Reports on Biology and Medicine* 35: 478, 1977.
9. Gisler R, Lindahl P, Gresser I: Effects of interferon on antibody synthesis in vitro. *J Immunol* 113: 438, 1974.
10. Gresser I: Efect of interferon on the immune system. Colloquium 3 *b*. 1. Abstracts Reunion de FEBS. Jerusalem. Agosto, 1980.
11. Holstein Bethy A de, Knecher M, Teyssié AR: Inducción de interferón in vitro por virus Junin: efecto del tratamiento con el inhibidor. *Rev Asoc Arg Microbiol* 9: 22, 1977.
12. Holstein Bethy A de, Teyssié AR, Knecher LM, Samoilovich SR, Coto CE, Weissenbacher MC: Inducción de interferón por el virus Tacaribe. *Medicina (Bs. Aires)* 41: 177, 1981.
13. Johnson H, Baron S: Evaluation of effects of Interferon and Interferon inducers on the immune response. *Pharm Ther A* 1: 349, 1977.
14. Merigan Th: Human interferon as a therapeutic agent. Lecture Colloquium 3. Interferon. XIII Reunión FEBS. Jerusalem. Agosto, 1980.
15. Merigan Th, Oldstone M, Welsh R: Interferon productions during LCM infection of nude and normal mice. *Nature* 268: 67, 1977.
16. Nota NR, Nejamkis MR, Frigerio MJ, Guerrero LB de: Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junin. Efectos del suero antitimocito. *Medicina (Bs Aires)* 33: 398, 1973.
17. Senik A, Lucero M, Kolb JP, Stephanos S, Castagna M, Falcoff E: Both viral and immune T interferon trigger the cytolytic differentiation of mouse NK cells. Abst. 11.7.22. Workshop: Interferons as modulators of the immune system. IV Congreso Int. de Inmunología. París, Julio, 1980.
18. Strannegard O, Larsson I, Lundgren E, Miorner H, Persson H: Modulation of immune responses in newborn and adult mice by interferon. *Infection and Immunity* 20: 334, 1978.
19. Svet Moldavsky GJ, Nemiroskaya BM, Osipova TV: Interferonogenicity and antigen recognition. *Nature* 247: 205, 1974.
20. Teyssié AR, Holstein BA de, Knecher LM: Microtécnica de titulación de virus Junin. Res. Reunión Científica de Comunicaciones. Sociedad Argentina de Virología. Castelar. Agosto, 1979.
21. Teyssié AR, Knecher LM, Holstein BA de: Interferón en la infección in vitro con virus Junin. *Medicina (Bs Aires)* 37: Supl. 3, 53, 1977.
22. Vignaux F, Gresser I, Fridman WH: Effect of interferon type 1 on the primary antibody response in suckling and adult mice. Abst. 11.7.27. Workshop Interferons as modulators of the immune system. IV Congreso Int. de Immunología. París, Julio, 1980.

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 579-586 (1981)

IMMUNOCHEMICAL PROPERTIES OF SOLUBLE FRACTIONS OF *CANDIDA ALBICANS*

A. ALONSO, L. M. SCAVINI, C. H. PIONETTI, K. MOUCHIAN, SARA RODRIGUEZ

Centros de Alergía y de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires

Several reports [2, 3, 10, 11, 18, 20, 24] indicate that *Candida albicans* may be involved in both immediate and delayed type bronchial hypersensitivity in animals and man. This paper investigates the chemical composition and antigenic reactivity of *Candida albicans* soluble fractions against a rabbit anti-*Candida* serum, as well as in sensitized individuals.

Material and methods

Candida albicans (CA) was initially identified by characteristic colonial morphology and microscopic appearance in Gram-stained preparations. Final identification was made on the basis of sugar fermentations as glucose (+), maltose (+), saccarose (+) and lactose (—). An extract with 10 000 NPU/ml prepared by Frugoni's method [6] was used for column fractionation, while a 1 : 10 dilution was employed in the skin tests. The 14 soluble fractions were diluted in saline 1 : 10 for skin testing.

Subjects: Eighteen untreated allergic patients suffering from perennial rhinitis and bronchial asthma, showing positive sensitivity to CA extract in routine skin tests, were subjected to intracutaneous tests with 14 fractions from the most conspicuous tubes of the Sephadex and DEAE fractionations. All the subjects were otherwise healthy young adults aged 24.9 ± 7.6 years with reversible airway obstruction (atopic). There were 9 male and 9 female subjects. All had histories of asthma as defined by the American Thoracic Society [1]. Nine non-allergic subjects without CA skin sensitivity, carefully chosen from inpatients of the Internal Medicine Department, were employed as "controls" [16]. At the time the skin tests were performed, none of the allergic patients or "controls" were taking steroids, antihistamines or immunosuppresive drugs.

Experimental animals: Adult albino rabbits were immunized against the whole CA extract. Weekly intradermal injections of an emulsion of 0.5 ml of CA and 0.5 ml of complete Freund's adjuvant were administered during the 8 weeks of the study. Ten days after the last injection, the animals were bled to death. The sera obtained were stored at − 20° C.

Sephadex column fractionation: Undiluted CA extract was subjected to gel filtration by a Sephadex G-75 column. Equilibration of the 10 mm x 480 mm column and elution were done with 0.15 M Na Cl buffered with phosphate at pH 8 and 4° C. One and half milliliters of the extract were applied and aliquots of the same volume of the column eluate were collected. The protein content of each eluate was determined by absorbance at 280 nm in a LKB Uvicord spectrophotometer. The sugar content was determined by the indol method [4] using a mixture of galactose and mannose as standard solutions in the spectrophotometer at 470 nm.

Ion-exchange column fractionation: Two milliliters of the first peak obtained by Sephadex G-75 were concentrated by preevaporation, dialyzed against a phosphate buffer (0.01 M, pH 8) and passed through a column of 25 mm x 380 mm of DEAE cellulose. Elution was done with 0.01 M - 0.2 M phosphate buffer from pH 8 to pH 6. Protein and sugar contents were registered as mentioned above.

Received: 16-III-1981. Accepted: 7-V-1981.

Postal address: Centros de Alergia y Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas José de San Martín, Córdoba 2351, 1120 Buenos Aires, Argentina.

Immunological techniques: The CA extract and the fourteen fractions were tested against rabbit anti-CA serum by the Ouchterlony method [19] and immunoelectrophoresis [9] to evaluate its antigenicity in animals and the properties of the antibodies obtained. They were all left undiluted for the tests.

Skin testing: The CA extract and each fraction were filtered through a Millipore filter to assure sterility, and diluted 10 times with saline before use. Each patient received a total of seventeen intracutaneous injections of 0.02 ml; the controls received saline and histamine 1 : 1000. Intracutaneous tests were read at 10 to 15 minutes, when the histamine positive control had reached near-maximal size as 0 to 4 + whealflare for the immediate reaction. The 48 h-delayed type reaction was performed with 0.10 ml of each antigen and read conventionally considering induration size.

Molecular wights: Several proteins such as Bovine Serum Albumin (M.W. : 66 000), Egg Albumin (M.W. : 45 000), Trypsinogen (M.W. : 24 000) and Lysozyme (M.W. : 14 300) from Sigma Chemical Co. used as marker proteins were subjected to gel filtration by a Sephadex G-75 column. Each protein concentration including CA was 12.5 mg usually in a volume of 1.5 ml meanwhile CA was in a volume of 0.83 ml Equilibration of the 10 mm x 480 mm column and elution were done with 0.15 M Na Cl buffered with PBS at pH 8 and 4° C. One and half milliliters of each substance were collected and submitted to a LKB Uvicord spectrophotometer at 280 nm [15].

Radioimmunoassays: Serum IgE was measured by the radioimmunosorbent method (PRIST) using Phadebas IgE-kits (Pharmacia, Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), strictly following the recommended instructions. Serum IgE levels are expressed in KU/l [23]. RAST testing was assayed according to the method described [25] in which CA extract (12.5 mg/ml protein) was covalenty linked to cellulose discs (Whatman nº 1) with cyanogen bromide. Results are given as the counts compared with those of the Phadebas RAST reference run in parallel.

Results

Fractionation of the CA extract on Sephadex G-75 resulted in one definite peak of protein (tube nº 10) and in 5 peaks with high sugar content (tubes nº 5, 8, 15, 40 and 61). Fractionation of the pro-

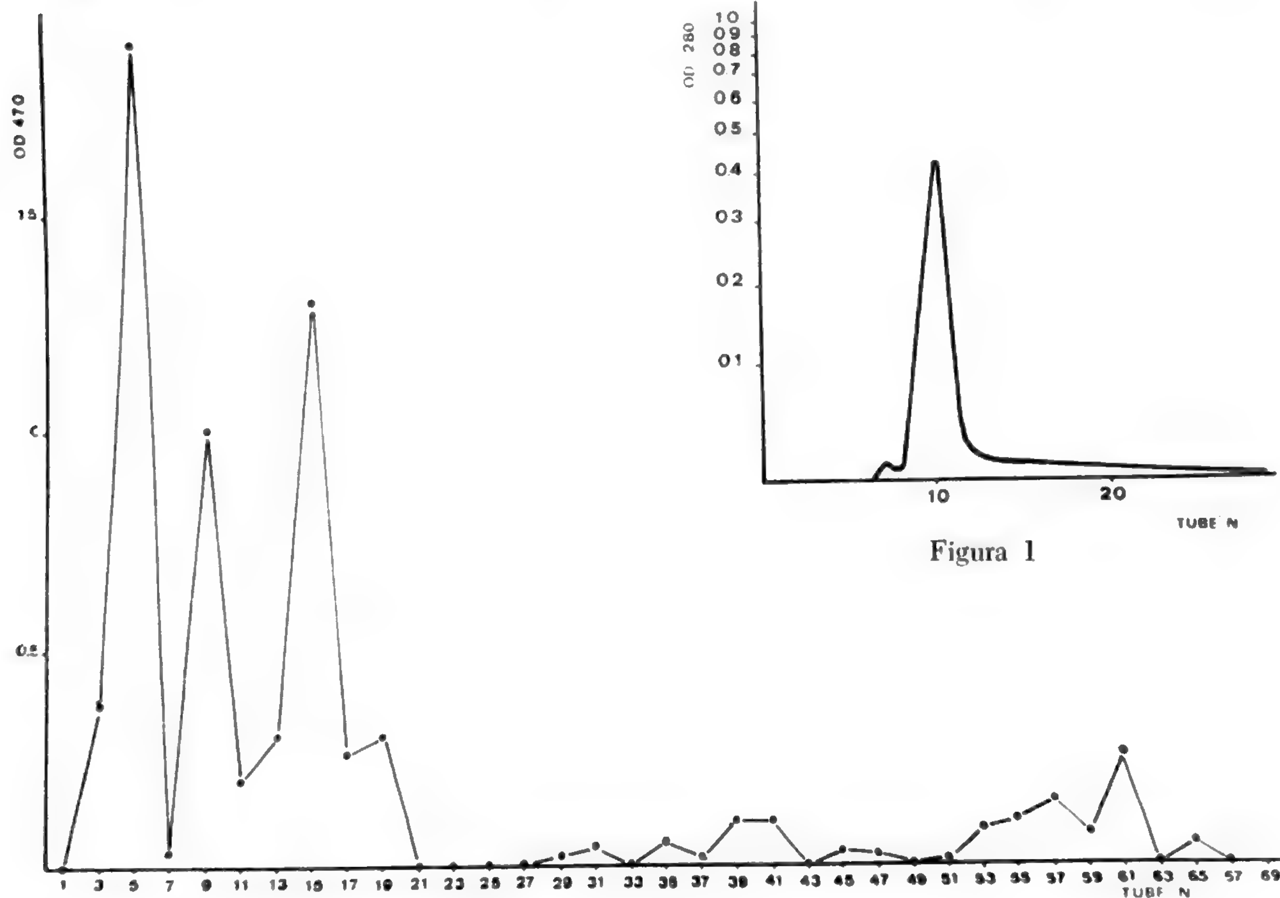


Figura 1

Figura 2

Figs. 1-2. — Fractionation of the CA extract on Sephadex G-75: **1,** One protein peak is observed at 280 nm OD; **2,** Five sugar peaks are recorded at 470 nm OD.

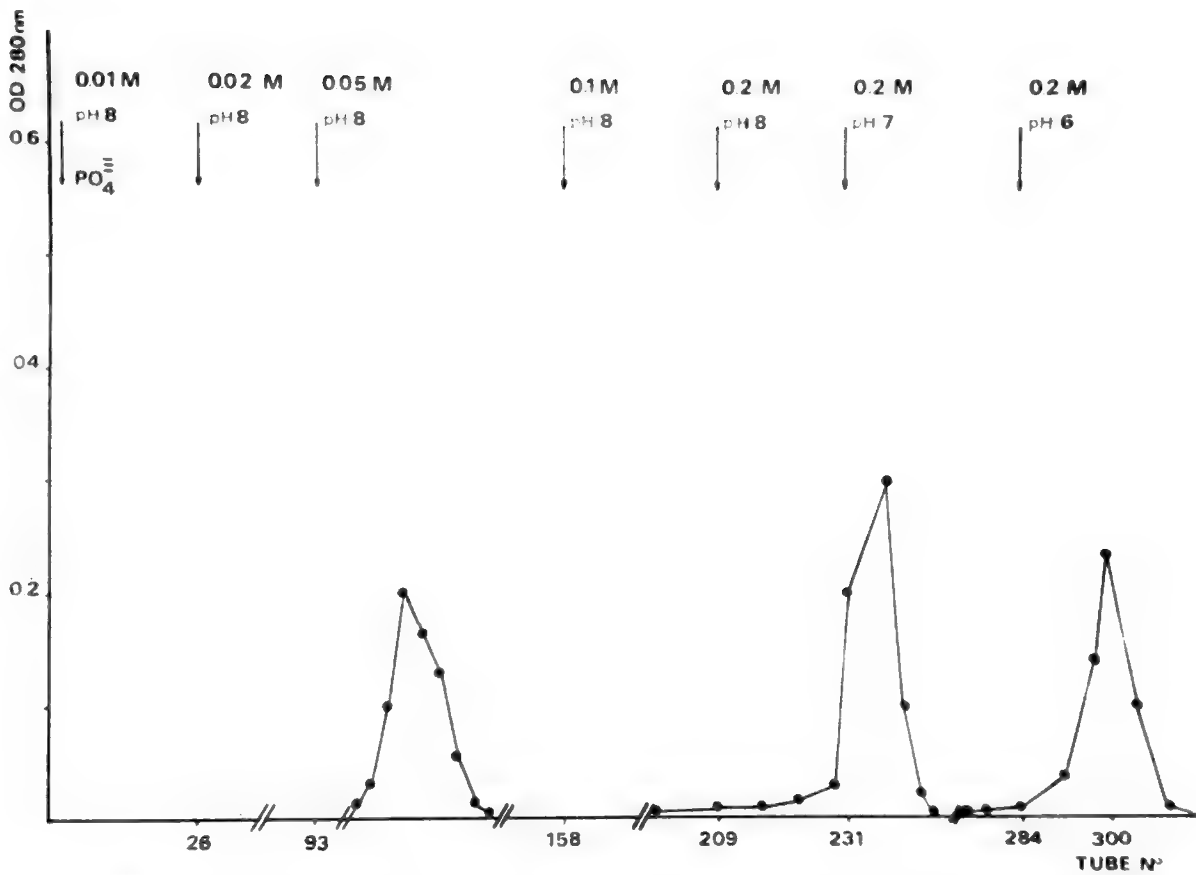


Fig. 3. — Fractionation of the protein peak by a DEAE-cellulose column. Three protein peaks are observed at 280 nm OD. The different buffer concentrations and molarities are marked with arrows.

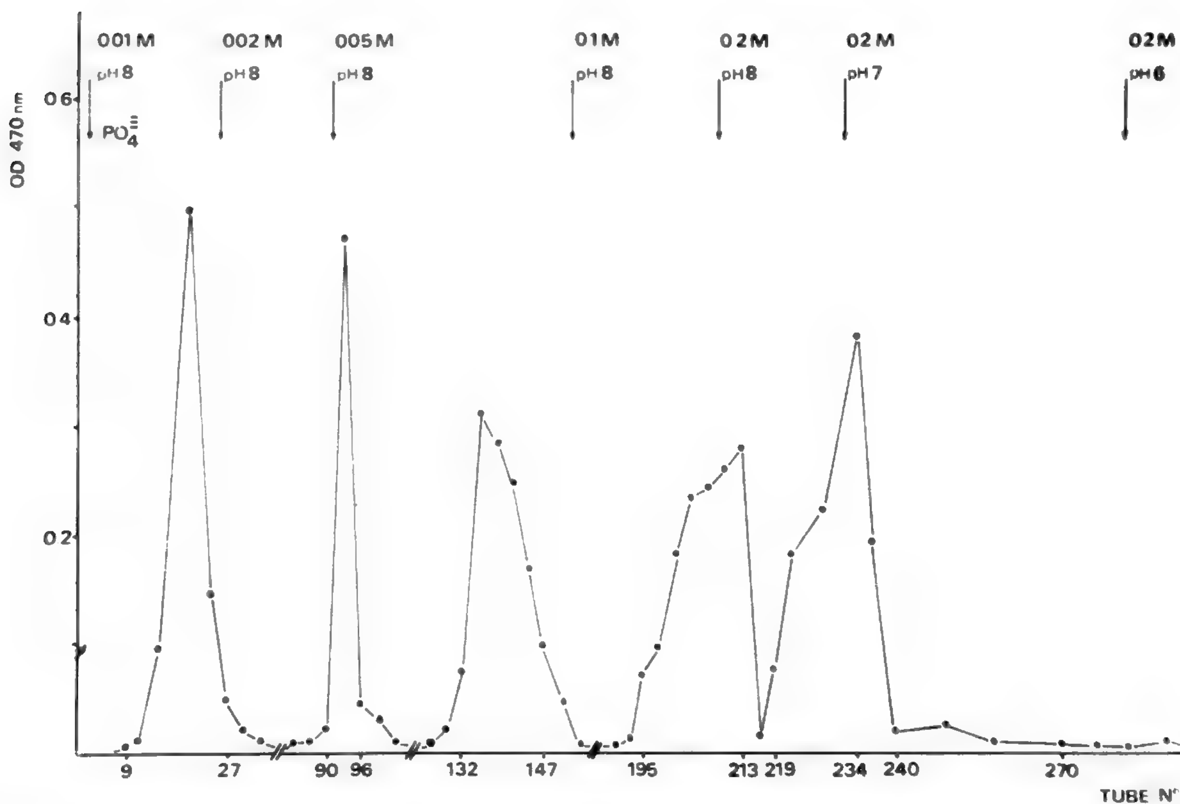


Fig. 4. — Fractionation of the protein peak by a DEAE-cellulose column. Five sugar peaks are recorded at 470 nm OD. The different buffer concentrations and molarities are marked with arrows.

TABLE 1. — *Immediate type reactions*

Substances			Patients																	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Saline solution								1			1									
Histamine 1 : 1000			4	2	4	3	2	2	2	3	4	3	2	3	3	2	2	2	3	2
CA	Extract	1 : 10	4	2	2	4	2	2	4	4	4	3	3	4	4	3	2	3	3	4
SP	10	1 : 10	3	1	2	3	2	2	3	3	4	2	2	4	3	2	1	2	3	2
SH	5	,,	2		2	2					2						1		2	
SH	8	,,	2		2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
SH	15	,,				1		2		1	1	2		2	1		2		2	2
SH	40	,,													1				1	
SH	61	,,													1				1	
DP	125	,,	2		2	2	2	2			2	2		2	2		2		2	2
DP	235	,,	1	1	2	2	1	2	1					2	2	1	1	1	2	1
DP	300	,,	2	1	2	1	2	1						2	2	1	1	1	1	1
DH	21	,,				1	2			1	1	2		2	2		2		2	2
DH	94	,,						2				2			2					2
DH	136	,,						1				1								
DH	207	,,																		
DH	229	,,				2	2					2		2	2		1			1
RAST (classes)			3	1	1	3	1	1	3	3	3	1	1	2	2	3	1	1	1	3

Footnote: S = Sephadex; P = Protein; H = Hexose; D = DEAE-cellulose.
The number following SP, SH, DP and DH represents the tubes of eluated fractions.
The number in patients zone represent the number of positives for skin tests, according to the following wheal-flare size criteria:
1 + = 1-4 mm; 2 + = 5-9 mm; 3 + = 10-14 mm; 4 + = more than 15 mm. The blank spaces mean zero.

TABLE 2. — *Delayed type reactions*

Substances			Patients																	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Saline solution											1									
Histamine 1 : 1000											1									
CA	Extract	1 : 10	4	3	4	4	4	3	3	4	3	3	4	3	4	4	3	3	3	3
SP	10	1 : 10	2	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2
SH	5	,,					1						1			1				1
SH	8	,,	2	1	2	2	2	1	1	2	1	2	2	1	1	2	1	1	2	2
SH	15	,,	1						1				1							
SH	40	,,																		
SH	61	,,																		
DP	125	,,	2			2				2			2		2	2			2	2
DP	235	,,	2		2	2							2		2					2
DP	300	,,	2			2							2		1					1
DH	21	,,	1			1			1				1			1				
DH	94	,,																		
DH	136	,,	2		2	2				2			2		2					2
DH	207	,,																		
DH	229	,,	2			2				2										

Footnote: S = Sephadex; P = Protein; H = Hexose; D = DEAE-cellulose.
The number following SP, SH, DP and DH represents the tubes of eluated fractions.
The numbers in patients zone represent the number of positives for skin tests, according to the following induration size criteria:
1 + = 1-4 mm; 2 + = 5-9 mm; 3 + = 10-14 mm; 4 + = more than 15 mm. The blank spaces mean zero.

tein peak on DEAE-cellulose produced three other protein peaks (tubes nº 125, 235 and 300) and five peaks with sugar content (tubes nº 21, 94, 136, 207 and 229). Figures 1, 2, 3 and 4.

The Ouchterlony test showed precipitin lines between the anti-Ca serum and the CA extract and the fractions from tubes nº 10 from Sephadex and tubes nº 21 and 229 from DEAE-cellulose. The other fractions appeared negative except tube nº 125 from DEAE-cellulose which gave spurious results. Immunoelectrophoresis showed precipitin lines between the rabbit anti-Ca serum and the CA extract and the fractions from tube nº 10 from Sephadex and tube nº 21 from DEAE-cellulose. The other fractions gave negative results.

Skin tests showed positive results of the immediate type to histamine, CA, the protein fraction from tube nº 10 and to the sugar fractions from tubes nº 5, 8 and 15 from Sephadex G-75. The proteins belonging to tubes nº 125, 235 and 300 and the sugars obtained in tubes nº 21, 136 and 229 from DEAE-cellulose also gave type I positive results (Table 1). Delayed-type reactions were obtained with Ca and proteins from tube nº 10 from Sephadex C-75 as well as tubes nº 125, 235 and 300 from DEAE-cellulose (Table 2). Sugars from tube nº 8 of Sephadex G-75 and tubes nº 136 and 229 from DEAE-cellulose also gave induration at a 48 h intervals. "Controls" were negative with all the fractions.

Molecular weights: A drop-counting fraction-collector was employed and fractions of 1.5 ml were collected. Four peaks corresponding to Bovine Serum Albumin, Egg Albumin, Trypsinogen and Lysozyme were recorded. Each peak was tested by immunodiffusion against a rabbit anti-CA serum and an anti-Bovine Serum Albumin; precipitin lines appeared with Bovine Serum Albumin in the first tubes meanwhile CA revealed precipitin lines after the Egg Albumin peak. Molecular weights of the four marker proteins were plotted on a semilog. scale versus elution volume. The extrapolated value for CA was 30 000.

Radioimmunoassays. Total IgE levels: Control patients showed values between 10 and 70 KU/l whereas the atopic patients ranged between 140 and 680 KU/l with an average value of 302.7 KU/l. The specific anti-*Candida albicans* IgE-RAST antibody revealed 0 class for the control group; on the other hand, the atopic group showed nine cases of class 1, two cases of class 2 and seven cases of class 3.

In those patients belonging to class 3, a direct correspondence was established between RAST and skin tests. In the rest of the atopic patients, skin tests appeared more demonstrative than RAST though other immunological or non immunological unrelated factors should be taken into account before conclusive remarks are made.

Discussion

Previous studies have shown that delayed skin reactions could be elicited in guinea pig [11] and in mice [8] with a protein fraction from extracts of *Candida albicans* [13]. Aoki et al [2, 3] reported that crude polysaccharide and crude protein fractions, when injected into guinea pigs previously exposed to living *Candida albicans* organisms, were capable of provoking delayed reactions. However, their activity was markedly reduced by digestion with proteolytic enzymes. Evidence also suggests that the polysaccharide fraction elicits immediate reactions, whereas the protein fraction evokes dual skin reactions consisting of weak immediate and strong delayed responses in guinea pigs as well as in men. Kabe et al [11, 12] carried out a bronchial challenge with *Candida albicans* and protein, as well as with a polysaccharide fraction, obtained by chemical fractionation in *Candida albicans*-sensitized guinea pigs. These authors pointed out that the polysaccharide elicited a type I allergic reaction, whereas the protein provoked both type I and type IV allergic reactions [13]. Kurimoto et al [14] observed a relationship between skin tests, bronchial challenge and serology in *Candida albicans* allergic asthma in men, involving type I and type

III mechanisms. A clinical response to CA developed more frequently in patients with positive bronchial and skin tests than in those with negative tests. Following physicochemical fractionation, we found at least four protein fractions in tube nº 10 from Sephadex and in tubes nº 125, 235 and 300 from DEAE-cellulose. On the other hand, ten peaks with high sugar content were obtained using Sephadex (tubes nº 5, 8, 15, 40 and 61) and DEAE-cellulose (tubes nº 21, 94, 136, 207 and 229). Their immunologic reactivity was demonstrated by precipitation methods: Ouchterlony and immunoelectrophoresis showed precipitin lines between the rabbit anti-*Candida albicans* serum and the CA extract, the protein fraction from tube nº 10 and the sugars from tubes nº 21 and 229.

Skin tests in sensitized humans revealed immediate and delayed type reactions especially when using eluated fractions with high protein content. Considering that the sugars showed similar reactivity, a glycoprotein(s) should be involved in these phenomena. On the other hand, these antigens induced the production of circulating antibodies of the IgG type in rabbits, and in infected humans [7], and presumably of immune complexes and a type III reaction as well [5, 21]. The latter are now being studied by the $C1_q$-I^{125} measurement [17]. RAST showed convincing data in only 50 % of the patients, so mechanisms other than the reaginic one occurring in the respiratory tract could produce rhinitis and asthma. Type IV reactions may also be involved [22]. These findings sustain the theory that protein fractions are more reactive than sugars in both immediate and delayed type allergic reactions. Other authors mountain opposing beliefs [12]. The discrepancy may be explained by considering the different techniques employed in obtaining the fractions, as well as the different physicochemical or stereochemical characteristics of the antigens.

Analysis of the amino acid and sugar content of each eluated fraction would yield more information on the chemical properties of the antigen molecule(s).

Summary

In order to study the chemical composition and immunologic reactivity of an extract of Candida albicans *(CA), aliquots of this antigen were passed through Sephadex G-75 and DEAE-cellulose ion-exchange columns. This method yielded 4 proteins and 10 sugars, whose quantities were determined by absorbance in an LKB Uvicord spectrophotometer at 280 nm and 470 nm respectively. Adult albino rabbits were immunized with CA complete Freund's adjuvant over a period of eight weeks. The antisera obtained were studied by the Ouchterlony method and immunoelectrophoresis against CA and the fourteen eluated fractions. Skin tests with CA and the fourteen eluated fractions were performed in 18 atopic untreated patients with perennial rhinitis and bronchial asthma, high reactivity to CA and high levels of serum IgE. Results were recorded after 10 to 15 minutes for the immediate reaction when the histamine positive control had reached near-maximal size and after 48 h for the delayed type reaction, considering the induration size. Ouchterlony showed precipitin lines among the anti CA serum, CA and the fractions from tubes 10, 21 and 229. Immunoelectrophoresis revealed precipitin lines among the antiserum, CA and fractions 10 and 21. The other fractions gave negative results. Skin tests showed type I reactions with CA, proteins nº 10, 125, 235 and 300 and sugars nº 5, 8, 15, 21, 136 and 229; type IV reactions appeared with CA, proteins nº 10, 125, 235 and 300 and sugars nº 5, 136 and 229. RAST showed convincing data in only 50 % of the patients, so mechanisms other than the reaginic one occurring in the respiratory tract could produce rhinitis and asthma. These findings seem to indicate that the protein fractions are more reactive than the sugars in both immediate and delayed type allergic reactions in humans and are more potent inducers of circulating IgG in rabbits. A glycoprotein antigen with a M.W. of 30 000 is suspected and methods of study are proposed.*

Resumen

PROPIEDADES INMUNOQUÍMICAS DE FRACCIONES SOLUBLES DE *Candida albicans.*

Muchos autores sostienen la idea que la Candida albicans *contribuye antigénicamente al desarrollo de reacciones de hipersensibilidad bronquial de tipos I y IV de Gell y Coombs, tanto en los animales como en el hombre. Esta presentación aporta nuevas evidencias acerca de la composición química y la reactividad inmunológica de dicho antígeno, frente a un antisuero específico de conejo y en humanos riníticos y asmáticos sensibilizados. Un extracto de* Candida albicans *(CA) con 10 000 NPU/ml fue pasado por columnas de Sephadex G-75. El primer pico fue concentrado por perevaporación, dializado frente a un buffer de fosfato y pasado por columna de DEAE-celulosa con gradientes variables de molaridad y pH. Los contenidos en proteínas y hexosas fueron registrados en un espectrofotómetro LKB Uvicord a 280 nm y 470 nm, respectivamente. Si bien se analizaron 300 tubos en cada fraccionamiento, se emplearon en las experiencias aquellos con los contenidos más altos en proteínas y hexosas, respectivamente. El peso molecular determinado por columna y comparado con marcadores especiales es de 30 000 daltons aproximadamente. Por otro lado, conejos adultos fueron inmunizados con CA más adyuvante de Freund completo, de acuerdo con el esquema clásico, para obtener un antisuero específico en 8 semanas. Este antisuero fue testificado con CA y con cada una de las fracciones obtenidas por Ouchterlony e inmunoelectroforesis; en todos los casos, el suero y los antígenos se emplearon sin diluir. Dieciocho pacientes atópicos con IgE total mayor de 100 KU/l y con alta reactividad cutánea a CA fueron testificados con las 14 fracciones más significativas (4 proteínas y 10 hexosas) mediante pruebas intracutáneas de lecturas inmediata y tardía. Por medio de la técnica de Ouchterlony se obtuvieron líneas de precipitación entre el antisuero y CA y las fracciones 10 (Sephadex) y 21 y 229 (DEAE-celulosa). La Nº 125 dio resultados poco consistentes y no reproducibles. La inmunoelectroforesis dio bandas de precipitación entre el antisuero, CA y las fracciones 10 y 21, mientras que todas las otras fueron negativas. Las pruebas cutáneas de tipo inmediato dieron resultados positivos con histamina, CA y las fracciones proteicas del tubo 10 de Sephadex y de los tubos 125, 235 y 300 de DEAE-celulosa; las hexosas de los tubos 5, 8 y 15 de Sephadex y de los tubos 21, 136 y 229 de DEAE-celulosa también resultaron positivas con variable frecuencia e intensidad. Las pruebas cutáneas de tipo tardío evidenciaron positividad para CA, las proteínas 10, 125, 235 y 300 y las hexosas 5, 136 y 229. Se discuten los presentes hallazgos en relación a los de otros autores, destacando que las fracciones proteicas obtenidas por estos métodos aparecen como más reactivas que las hexosas, en ambos tipos de reacciones alérgicas, las que pueden estar vinculadas —por diferentes mecanismos— con la patología que se estudia. Considerando que estos antígenos pueden inducir la producción de anticuerpos del tipo IgG, la posibilidad de la formación de complejos inmunes ya señalada por otros, no puede ser descartada. El RAST sólo fue coincidente en el 50 % de los pacientes, y si bien en las pruebas cutáneas pueden intervenir factores individuales no inmunológicos, otros anticuerpos no pertenecientes a la clase IgE podrían estar involucrados en las rinitis y el asma. Se postula que la naturaleza del antígeno(s) podría ser glucoproteica y se adelantan vías de estudio en ese sentido.*

Acknowledgment: The authors acknowledge the valuable assistance of Drs. Ethel Annecchini and Maria Rosa Elias Costa.

Bibliografía

1. American Thoracic Society: Definition and classification of chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. *Am Rev Resp Dis* 85: 762, 1962.
2. Aoki Y, Nakayoshi H: Studies on the immunologically active substances in fungi. 2. On the immunologic activity especially skin test activity of *Candida* antigens. *Jap J Allerg* 17: 48, 1968.
3. Aoki Y, Nakayoshi H, Asaka S: Studies on

the substances for skin test activity of *Candida albicans*. *Jap J Med Mycol* 9: 200, 1968.
4. Dische Z: *In:* Methods of Biochemical Analysis. Ed. by D. Glick, vol. 2: 313, 1955.
5. Edge G, Papys J: Antibodies in different immunoglobulin classes to *Candida albicans* in allergic respiratory disease. *Clin Allergy*, 10: 47, 1980.
6. Frugoni C: *En:* Alergia Clínica. Hansen K. y Werner M., Ed. Salvat 1970, p. 586.
7. Gaines JD, Remington JS: Diagnosis of deep infection with *Candida*. *Arch Inten Med* 132: 699, 1976.
8. Hurtrel B: Delayed-type hypersensitivity reactions to *Candida albicans* in mice. *Ann Immunol (Paris)* 129: 653, 1978.
9. Iammarino RM: Immunoelectrophoresis adapted for the clinical laboratory. *Clin Biochem* 2: 447, 1969.
10. Itkin IH, Dennis M: Bronchial hypersensitivity to extract of *Candida albicans*. *J Allerg* 37: 187, 1966.
11. Kabe J, Miyamoto T: The role of allergic reactions of immediate and delayed type on the bronchospasm of guinea pigs. *Jap J Allerg* 18: 17, 1969.
12. Kabe J, Aoki Y, Ishizaka T, Nakazawa H, Tomaru M: Antigenicity of the fractions of *Candida albicans*. 1. The skin and the bronchial reactivity in man. *Jap J Allergy* 19: 91, 1970.
13. Kabe J, Aoki Y, Miyamoto T: Antigenicity of fractions from extracts of *Candida albicans*. *J Allerg* 47: 59, 1971.
14. Kurimoto Y: Relationship among skin test, bronchial challenge and serology in house dust and *Candida albicans* allergic asthma. *Ann Allergy* 35: 131, 1975.
15. Leach AA, O'Shea PC: The determination of protein molecular weights of up to 225.000 by gel filtration on a simple column of Sephadex G-200 at 25° and 40°. *J Chromatog* 17: 245, 1965.
16. Negroni P, Negroni R: Micosis cutáneas y viscerales. López Libreros, Bs. As., 7a. Ed., 194, 1980.
17. Nydegger ME, Lamber PH, Gerber H, Miescher PA: The $C1_q$ binding assay. *J Clin Invest* 54: 297, 1974.
18. Oshima Y, Ishizaka T, Kabe J, Miyamoto T: Delayed-type reaction in bronchial asthma-experimental and clinical study. Abstracts Book, VII International Congress of Allergology, 1970, p 80.
19. Ouchterlony O: Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr Allergy* 5: 1, 1958.
20. Pepys J, Faux JA, Longbottom JL, McCarthy DS, Hargreave FE: *Candida albicans* precipitins in respiratory disease in man. *J Allerg* 41: 305, 1968.
21. Pepys J: Immunological mechanisms in allergy to *Candida albicans*. *Ann Allerg* 32: 279, 1974.
22. Podleski WK: Cytodestructive mechanisms provoked by lymphocytes. *Amer J Med* 61: 1, 1976.
23. Salmon SE, Mackey G, Fudenberg H: Sandwich solid phase radio-immunoassay for the quantitative determination of human globulins. *J Immunol* 103: 129, 1969.
24. Solari MA: *Candida albicans:* su incidencia en alergia clínica. *Prensa Méd Argent* 53: 1320, 1966.
25. Wide L, Bennich H, Johansson SG: Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. *Lancet* 2: 1105, 1967.

— — — —

Noble cosa es, aun para un anciano, el aprender.

Sófocles, 405-406 a.JC

Fragmenta, 224

 ISSN 0025-7680

ICTERICIA, CLORAMFENICOL Y APLASIA MEDULAR

M. C. de R., 25 años, sexo femenino. H. C. Nº 57976. Autopsia 2404. Ingresó el 10-IV-81 y falleció el 14-IV-81.

Comienza en diciembre de 1980 con síndrome ictérico, efectuándose el diagnóstico de hepatitis viral aguda, aconsejándosele reposo, que la paciente no cumple. En marzo de 1981 aparece metrorragia y una angina pultácea, fiebre y adenomegalias cervicales. Es tratada con gentamicina y cloramfenicol durante 48 horas. Se agregan epistaxis y sangrado de encías, consultando al Hospital del Tigre, donde es transfundida con 1 litro de sangre. El 6 de abril es atendida en el Hospital de San Fernando, se le realiza una punción de médula ósea (PMO), es transfundida y trasladada al Instituto de Investigaciones Médicas con el diagnóstico de aplasia medular. No tenía antecedentes personales de importancia.

A su ingreso, en el examen físico, la paciente estaba lúcida, ansiosa, facies edematosa, masas musculares dolorosas, hemorragia subconjuntival en ojo derecho, encías sangrantes. En la auscultación pulmonar, estertores crepitantes bibasales. Auscultación cardíaca, 3er. ruido con cadencia de galope. Abdomen indoloro, hepatomegalia palpable a 5 cm, dura y dolorosa. No se palpaban bazo ni riñones. Tono muscular disminuido. Hiporreflexia patelar y aquiliana. Hemorragias retinianas. Radiografía de tórax: Focos bronconeumónicos en ambas bases. Corazón normal. Análisis de laboratorio: Hto. 33 %. Hb: 10.6 g %, leucocitos 600/ mm^3 (Seg N 4 - Mon 4 - Linfo 92). Eritrosedimentación 30 mm en la 1ª hora. Glucemia 0.50. Urea 1.70 g %. T. de Quick 17 seg (49 %). PTTK 43 seg. Plaquetas ausentes. Gases en sangre: PO_2 76 mm, pH 7.37, PCO_2 21.5 mm Hg, $CaCO_2$ 13 mEq/l, CO_3H^- 12.5 mEq/l, EB - 12 mEq/l, EB FEC 11.5 mEq/l.

Evolución: Paciente febril, taquipneica, taquicárdica con ritmo de galope, oligúrica. Se inicia tratamiento antibiótico con amikacina-cefalotina. Al día siguiente hipotensa, con piel caliente, se inicia goteo con dopamina 58 μg/kg. min. Obnubilación. Mialgias. Petequias. Gases en sangre con máscara al 40 %; PO_2 130 mmHg; pH 7.42; PCO_2 38 mmHg; CO_3H 24 mE/l; % Sat O_2 98.6; EB 0; BBN 46.4 mEq/l; urea 1.90 g ‰; potasio 3.2 mEq/l; creatinina 1.32 mg %; fosfatasa alcalina 38 mU/ml; TGO 20 mV/ml; TGP 35 mU/ml; Hto 33 %; GB 600 / mm^3; ácido úrico 6.2 mg %; Mg 2.20 mEq/l; bilirrubina total 2.8 mg %; directa 2.3 mg %; amoníaco 2.60 γ/ml. Continuó hipotensa, lúcida, con igual medicación (cefaletina 4 gramos; amikacina 1 gramo; prednisona 40 mg/día; dopamina 5 a 10 μg/kg/min). Persistieron las imágenes algodonosas pulmonares. Se administraron 5 unidades de leucocitos y plaquetas. El día 14-IV está taquicárdica, con frote pleural en base derecha, ruidos cardíacos alejados. La dificultad respiratoria fue progresando, hasta deprimirse, fue entubada y ventilada. Superó un paro cardíaco, respondiendo al masaje cardíaco externo; queda con flacidez generalizada, hiporreflexia y anisocoria, reflejo fotomotor y corneal ausentes. Fallece horas más tarde. Gases sanguíneos del día 15/IV ventilada: PO_2 53.5 mmHg; pH 6.88; PCO_2 57.5 mmHg; EB 18.5 mEq/l; EB FEC 21 mEq/l; albúmina 1.80 g %; globulina 2.70 g %; colesterol 70 mg %.

Discusión clínica

Dr. D. Kniznik: La evolución de la paciente estuvo determinada por la aplasia medular, que la predispuso a sepsis grave, manifestación que junto a las hemorragias que ocurren en esta patología constituyen un estereotipo en el período terminal. El interés del caso reside en la alteración hematológica que probablemente estuvo asociada a un episodio de hepatitis viral aguda que padeció tres meses antes de su muerte. Las manifestaciones hematológicas de la hepatitis viral aguda frecuentemente consisten en una anemia leve, baja reticulocitosis, sobrevida eritrocitaria disminuida, leucopenia y, menos frecuentemente, agranulocitosis, trombocitopenia,

— — — —

Reunión anatomoclínica efectuada en el Instituto de Investigaciones Médicas el 24/VII/81. Editores: Dres. M. A. Castro Ríos y H. J. Delisio.

aplasia pura de células rojas, y la más grave y menos frecuente que es la aplasia medular. Históricamente no se reconoció esta asociación, a tal punto que se mencionaba la ictericia como un síntoma en la evolución de ciertas aplasias especialmente a las asociadas a tratamientos con cloramfenicol, luego fue más claro que el episodio de ictericia era debido a hepatitis viral aguda, se postuló luego que la insuficiencia hepática producía niveles altos de dicho medicamento o sus productos metabólicos, contribuyendo a su mielotoxicidad. La aplasia medular asociada a hepatitis que creo es lo que tuvo la paciente, se describe en dos contextos; por un lado puede desencadenarse en la etapa aguda de la hepatitis o en cualquier momento en el transcurso del primer año o después del primer hasta el tercer año de padecida. En el primer caso no existe correlación entre la severidad de la hepatitis y la aplasia, o sea que puede tratarse desde una hepatitis leve hasta cuadros graves con necrosis submasiva, hepatitis crónica y cirrosis o bien no encontrarse en la histología ninguna evidencia. El cuadro histológico de la médula ósea es inespecífico, existe desaparición de los precursores de las tres series y ocasionalmente hemorragias intramedulares. En el segundo grupo de esta asociación, la histología hepática es la de una hepatitis crónica o una cirrosis, el cuadro medular consiste en una hipoplasia con arresto de maduración. La desaparición de la médula ósea permite deducir que la hepatitis fue aguda, pero es difícil predecir en base a los datos clínicos la histología. Al llegar al Instituto la paciente estaba levemente ictérica, tenía hiperamoniemia, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia y moderado ascenso de la GPT. Todo esto puede ser atribuido a un hígado de sepsis. Por lo tanto no contribuyen al diagnóstico diferencial. En base a la evolución clínica cabría esperar pocas evidencias de la hepatitis viral aguda, pero esto no niega que la enfermedad haya ocurrido, porque el antecedente de ictericia le da fuerza al diagnóstico de la mencionada asociación. Entre otros aspectos cabe señalar la insuficiencia renal, de la que se plantean los diagnósticos diferenciales de síndrome hepatorrenal, necrosis tubular aguda, enfermedad glomerular y toxicidad por litio, esto último poco probable porque recibió sólo dos dosis (600 mg), y en contra del síndrome hepatorrenal faltan varios criterios. Por lo tanto, el diagnóstico más probable es el de necrosis tubular aguda. En el sedimento de orina aparecen cilindros hemáticos que sugieren patología glomerular, fenómeno descripto en la hepatitis por virus B, en la asociación entre aplasia y hepatitis, pero en general no es el virus B el responsable de la misma, y quizás sea la diátesis hemorrágica por trombocitopenia la que explique la presencia de dichas anormalidades del sedimento.

En definitiva creo que la enferma tiene una aplasia medular secundaria a una hepatitis viral aguda, una necrosis tubular aguda y bronconeumonía a gérmenes gramnegativos.

Dra. M. Molina: Si nos referimos a los datos de laboratorio y clínicos que tenía, creo que no cabe duda que esta paciente fue portadora de una severa aplasia medular. Actualmente se considera que en las aplasias medulares, en el 50 ó 60 por ciento de los casos es muy difícil llegar a algún diagnóstico etiológico, y casi todas ellas quedan como de origen idiopático. En este caso particular recuerdo haber interrogado personalmente a la familia y al marido de la paciente. El antecedente de una hepatitis que ella presentó en el mes de diciembre del año pasado, es decir tres meses previos a la internación en este Instituto, parece haber sido cierto. Nunca pudimos conseguir los análisis de laboratorio de ese momento. Según lo que refirió la familia, la paciente había estado ictérica; aparentemente con un cuadro benigno de corta duración, que no requirió reposo absoluto en los meses siguientes. La paciente se casó a fines de febrero y según referencias de la familia ya en ese momento presentaba cansancio y astenia, pero no se realizó ningún tipo de control de laboratorio. En el mes de marzo, después de la menstruación, persiste con hemorragia vaginal durante varios días. Lo único que se le efectuó en ese momento fue un examen ginecológico, que aparentemente fue normal. Con posterioridad a esa metrorragia, presentó un cuadro gripal y recibió duran-

te cuarenta y ocho horas cloramfenicol. Aparentemente, ella refería astenia y adinamia previo a la administración del cloramfenicol. Después aparece todo el cuadro por el cual es derivada al Instituto, de manera que uno podría presuponer que la posible etiología de su aplasia medular fue la hepatitis viral y no el cloramfenicol. Ya mencionó el Dr. Kniznik que esta asociación de aplasia medular y hepatitis viral aguda ha sido descripta en numerosos casos. En la literatura hay aproximadamente trescientos casos descriptos de aplasia medular asociada posteriormente a una hepatitis viral aguda. Prácticamente todas las hepatitis virales agudas suelen cursar con cierto compromiso de médula ósea y se supone que es así porque tanto el sistema retículo endotelial del hígado como de la médula ósea tienen el mismo origen. Por lo tanto, aquellas noxas que dañan al hígado probablemente también afecten al sistema retículo endotelial de la médula ósea. Por eso se describe en las hepatitis habituales leucopenia, trombocitopenia y también anemia aparentemente por cierta inhibición de médula ósea que se da al comienzo de la hepatitis viral. No se puede entender, y hasta ahora nadie ha podido explicar con certeza, por qué el 99 % de los pacientes que presentan una hepatitis viral aguda, aún cuando tengan hipoplasia medular transitoria, no evolucionan después a cuadros de aplasias medulares severas. Sólo el 0.01 a 0.02 % de los pacientes que cursan una hepatitis viral aguda van posteriormente a una aplasia medular. Con la característica de que esa aplasia medular raramente coincide con el curso de la hepatitis aguda, sino que suele aparecer cuando el paciente ya se ha recuperado de la hepatitis viral. Tiene un período hematológico normal y después bruscamente comienza con manifestaciones hemorrágicas y en ese momento se detecta la aplasia medular. El período de latencia de la aplasia medular es de alrededor de diez semanas posteriores a la hepatitis viral aguda; pero ese período de latencia puede ser muy variable; y cuanto más corto sea dicho período más grave es la aplasia medular que se observa. Lamentablemente la mayor parte de los casos descriptos en la literatura de aplasia post-hepatitis son anteriores a los años '74 y '75 y por lo tanto la mayoría de estos enfermos no tienen hechos estudios de cultivos de médula ósea, que es la manera de poder establecer en algunos casos el diagnóstico etiológico frente a una aplasia medular. El hecho que estos pacientes responden muy bien a los transplantes de médula ósea, hace suponer que la lesión básica debe ser una lesión de *stem-cells* de la médula ósea. ¿Por qué el virus de la hepatitis produce esa lesión de *stem-cells*? Se han postulado distintos mecanismos por los cuales puede actuar el virus: 1º) En una época se pensó que fueran cepas más virulentas las que trajeran la aplasia post-hepatitis, pero se contradice con el hecho que habitualmente son hepatitis de curso muy benigno. 2º) También se ha dicho que probablemente el virus pueda producir alguna alteración en la composición cromosómica de las *stem-cells* de la médula ósea, y que eso lleve a la progresiva destrucción de esas células y a su no reproducción. Esto sería avalado por el tiempo de latencia de semanas o meses entre la hepatitis viral aguda y el desarrollo de la aplasia. 3º) Se ha postulado que el virus lesiona las *stem-cells* por acción tóxica directa. 4º) Otra etiología posible, que ha sido probada en algunas aplasias medulares idiopáticas, es que el virus produzca alguna reacción inmunológica de tipo autoinmune, que destruya las *stem-cells* de la médula ósea. Sin embargo, en oposición a esto las aplasias post-hepatitis responden bien a los transplantes de médula ósea, aun en aquellos casos que no se administra inmunosupresión previa. Podría suceder también que la respuesta inmunológica destruya las *stem-cells* y luego desaparece y entonces al realizar estudios in vitro con cultivos de colonias no pueda probarse el mecanismo inmunológico. En resumen, lo que sí es seguro es que estos pacientes tienen destrucción de *stem-cells* de la médula ósea, con aplasias muy severas y que por lo general no responden al tratamiento habitual. Se ha descripto que el 70 u 80 % de las aplasias post-hepatitis se ven en el hombre y no en la mujer, y generalmente en personas de menos de treinta años. En cuanto a la evolución y al pronóstico es mucho peor

en las mujeres que en los hombres: prácticamente el 100 % de las mujeres mueren, y en los hombres el 70 u 80 % [1-2]. En cuanto al tratamiento, en estas severas aplasias, de curso rápidamente evolutivo, no suele haber respuesta a corticoides; con el empleo de andrógenos, hay algunos casos aislados descriptos de discreta mejoría en la cifra de hematocrito y de glóbulos blancos, pero aparentemente esa mejoría es transitoria y luego recae la aplasia medular. Con referencia a la utilización del litio que se planteó durante la internación de esta paciente, debemos recordar que el litio aumenta el factor estimulante de colonias, haciendo que las colonias residuales granulocíticas de la médula se desarrollen. Pero si uno postula que ésta es una enfermedad por destrucción de *stem-cells*, por más que se emplee litio, dicha droga no tiene sobre qué actuar. En realidad, el único tratamiento que se ha utilizado con cierto éxito es la posibilidad del transplante de médula ósea, con donante relacionado HLA idéntico [3]. Se ha observado un cincuenta por ciento de sobrevida al año, luego del transplante de médula ósea. Es importante recordar para algún caso futuro de aplasia medular post-hepatitis la posibilidad de derivarlo a algún centro especializado en transplantes de médula ósea. En ese caso, el paciente debe recibir la menor cantidad posible de transfusiones, ya sea de glóbulos rojos, de glóbulos blancos o de plaquetas y que éstas no sean de familiares directos, para evitar que formen anticuerpos contra algún antígeno menor de histocompatibilidad puesto que alguno de sus familiares directos posiblemente será el futuro donante de médula ósea. Con respecto al cuadro pulmonar de esta paciente, creo que presentaba una bronconeumonía y debido a la agranulocitosis que tenía coincido con el Dr. Kniznik en que es probable que encontremos úlceras necrotizantes en todo el tubo digestivo o a nivel del colon.

DR. J. B. PALMITANO: Como ya se mencionó las alteraciones hematológicas en la hepatitis viral aguda pueden ser múltiples y lo más frecuente es una anemia leve, pero la más importante y severa, como también se mencionó, es la aplasia medular. Los primeros casos descriptos de aplasia medular post-hepatitis viral, aparecieron en el año cincuenta y cinco y a partir de allí fueron aumentando el número de casos publicados. En el año 74 aparece un artículo donde se hace una revisión extensa de la aplasia medular post-hepatitis viral, en donde seleccionan 80 casos, y digo seleccionan porque se descarta cualquier otra causa probable de aplasia medular, salvo el antecedente de hepatitis viral aguda, y de este trabajo surgen como hechos importantes la alta mortalidad de estos pacientes, que alcanza un 90 %, y el transplante de médula ósea precoz que sería el tratamiento más útil en estos casos. En el año 75 aparece otro artículo [4], en donde se publicaron alrededor de doscientos casos encontrados hasta ese momento, también se habían descartado otras causas de aplasia medular, excepto la hepatitis. En general, en todos los artículos se destaca que son pacientes jóvenes, generalmente hasta los veinte o veinticinco años de edad, en donde la aplasia medular aparece en un promedio de diez semanas después de un episodio agudo de hepatitis viral, pero puede aparecer hasta 9 meses o un año después del episodio y no depende de la gravedad de la hepatitis viral. En todas las publicaciones se menciona que las alteraciones de laboratorio e histológicas en cuanto al hígado se pueden encontrar variantes, pero generalmente la mayoría describe hallazgos histológicos compatibles con una hepatitis viral en vías de curación o curada. No está descripto así asociaciones con hepatitis crónicas o hepatitis sub-masivas en momentos precoces cuando

— — — —

[1] Ailouni K, Doeblin T: The syndrome of hepatitis and aplastic anemia. *Brit Haematol* 27: 345, 1974.

[2] Montalban C, Alodrez Sánchez B, Arechaga S, Villalobos Martínez E, Outeriño J, Sánchez Fayos J: Anemia aplástica post-hepatitis. Estudio clínico y hematológico de 10 casos. *Rev Clín Española* 146: 151, 1977.

[3] Thomas ED: Current status of marrow transplantation for aplastic anemia and acute leukemia. *Am J Clin Pathol* 7: 887, 1979.

[4] Hagler L, Pastore RA, Bergin JJ, Wrensch MR: Aplastic anaemia following viral hepatitis. *Medicine* 54: 139, 1975.

aparece la aplasia medular. Hasta el año 75 se describía que en muchos pacientes se efectuaban antígeno de superficie, con lo cual descartaban en la gran mayoría (casi todos) una hepatitis a virus B, pero en realidad en esa época los estudios para descartar virus B, o no A no B, no eran altamente específicos o tan sensibles como en la actualidad. Es así que después del 75 han aparecido publicaciones de aplasia medular post-hepatitis a virus B, como una que se menciona en un *Archives of Internal Medicine* [5], donde hay una aplasia medular severa, con muerte del paciente luego de una hepatitis viral por virus B. Aquí se destaca la aparición precoz de la aplasia medular, precoz digo, con respecto al cuadro clínico de hepatitis y probablemente esto sea debido al largo período de incubación y a la viremia larga que tiene la hepatitis B. Este es el único caso que encontré en la literatura de hepatitis B y aplasia medular. Hay otros artículos que describen, y son varios, la presencia de aplasia medular post-hepatitis no A no B, generalmente tiene un antecedente post-transfusional múltiple y se ha descartado por anticuerpos anti A y por antígenos de superficie negativo para la B, y otro tipo de virus como citomegalovirus o EBV *(Epstein Barr virus)* entonces la catalogan como no A no B, y son aplasias medulares post-hepatitis no A no B. En realidad no se describe una aplasia medular sino que se describen hipoplasias de series rojas, y que son transitorias y generalmente con buena evolución del paciente; es por eso que se discute un poco lo que otros autores decían o preconizaban del tratamiento precoz con transplante de médula ósea en casos de pacientes con hipoplasias transitorias. Con respecto a esta paciente, como ya se dijo, es muy probable que esta aplasia medular sea debida a la hepatitis viral, por el antecedente de hepatitis probable, por no tener otra causa previa a la aplasia medular, por la fecha de aparición y por la edad de la paciente. No podemos saber en el momento que la paciente fallece, o en el momento que presenta la aplasia medular y se interna aquí, cuál es el grado de lesión hepática con respecto a su hepatitis viral. Lo más probable de acuerdo a los casos citados por la literatura es que se encuentre una hepatitis en vías de resolución o una hepatitis resuelta. Sin embargo, se puede encontrar en esta paciente, por la evolución que presentó en los últimos días, por su cuadro séptico, compromiso hemodinámico, probablemente alteraciones hepáticas compatibles con isquemia o necrosis centrolobulillar lo cual puede justificar perfectamente la duplicación de transaminasas que tuvo y la leve elevación de la bilirrubinemia.

Dr. A. Zucchini: Esta paciente ingresó al IDIM séptica, oligúrica, con urea elevada, por lo que se planteó que asociado a su grave cuadro general tenía una insuficiencia renal aguda. Analizando los factores que pudieran ser predisponentes a esta falla renal, tenemos en primer lugar la sepsis, y unida a ella hemorragias, hipotensión e ictericia. La hiperbilirrubinemia es un factor que predispone a la vasoconstricción renal, aumentando la sensibilidad de la vasculatura renal a las catecolaminas que sin duda en esta paciente con hemorragias e hipotensión estarían sumamente elevadas; de allí nuestra observación de la frecuente asociación de IRA en el transcurso de sepsis grave con ictericia. Entre otras causas etiológicas en este caso merece comentarse el uso de drogas potencialmente nefrotóxicas, como son los aminoglucósidos, gentamicina y kanamicina, que recibió esta paciente antes y durante su internación en el IDIM. La nefrotoxicidad es paralela a la dosis, teniendo ésta un efecto acumulativo, ya que la vida media de estas drogas es 100 veces superior en el parénquima renal que en el plasma debido a que la eliminación de metabolitos activos es exclusivamente renal, de allí la necesidad del ajuste de la dosis de acuerdo a la CrPi o el ClCr. La manifestación de toxicidad comienza con un déficit de concentración de la orina, proteinuria de origen tubular (lisozemoria) y a veces glucosuria, todo ello manifestación de una lesión en el TCP, llegando a veces a la necrosis tubular pero que excepcionalmente determina anuria.

[5] Casciato DA y col: Aplastic anemia associated with type B viral hepatitis. *Arch Intern Med* 138: 1557, 1978.

De todas maneras el diagnóstico clínico de IRA debe ser completado mediante mediciones de laboratorio de los índices de fallo renal, así nos encontramos que al momento del ingreso presenta un Na urinario muy bajo de 4 mEq/l; el U/P de Cr era de 75 y la fracción de excreción del Na filtrado era menor del 1 % ($Fe_{Na\,\%}$). Sabemos que en el curso de una NTA la Fe_{Na} % es mayor al 1 %, el U/P de Cr es menor de 40 y el Na urinario es mayor de 20 mEq/l; por lo tanto, los datos que presentaba a su ingreso son coincidentes con los de una IRA de causa pre-renal, siendo esto explicado por disminución del flujo plasmático renal y vasoconstricción cortical como se ha descripto en cuadros clínicos caracterizados por bajo volumen minuto: hemorragias, falla de bomba aguda, hipotensiones severas, etc., presentes en el cuadro clínico de ingreso. Sin embargo la mala evolución posterior de la paciente con la perpetuación de estos mecanismos, corroborados por los altos requerimientos de dopamina para el mantenimiento de cifras tensionales aceptables, es muy probable que finalmente hallan llevado a la instalación de una NTA de causa vasomotora como creo será el hallazgo autópsico. La instalación de un síndrome hepatorrenal en esta paciente si bien los datos de laboratorio iniciales pueden ser coincidentes con él, ya que demuestran indemnidad de la función renal, se caracteriza primero por la presencia de hipertensión portal que creo la paciente no presentó y segundo una muy marcada disfunción hepatocelular, en la cual el hígado es incapaz de producir sustrato a la renina, disfunción que en esta paciente no fue tan severa salvo en sus momentos finales. Queda por comentar la presencia de microhematuria y cilindros hemáticos, que pudieran hacer pensar en una lesión glomerular pero que su hallazgo es también frecuente en las NTA.

Dr. E. E. Benarroch: Quiero mencionar dos síntomas para los cuales no encontré una explicación coherente; uno, la presencia de las mialgias y otro, la hiperestesia cutánea, que si bien pueden ser un hallazgo inespecífico en los cuadros sépticos, no excluyen la posibilidad de una miositis séptica o viral. El problema es que no hay aumento de las transaminasas ni hay valores altos del potasio, que se esperaría encontrar alto en algún momento de la evolución y se encuentra llamativamente disminuido, por lo menos, en algunos momentos. Los estados de confusión mental transitoria que acompañaban habitualmente a los desequilibrios hemodinámicos pueden atribuirse a los efectos o bien de los bacteremias subyacentes en dichos procesos o a los mismos cambios hemodinámicos encefálicos, de modo tal, que lo más importante desde el punto de vista neurológico, sería discutir el episodio final o los dos episodios finales. El problema es cuál es la secuencia de los hechos porque en la historia se refiere que el episodio de coma es precedido de bradicardia y depresión respiratoria. Evidentemente cuando el coma es precedido por bradicardia las dos preguntas fundamentales son: es el coma secundario a la alteración encefálica hemodinámica o es la bradicardia secundaria a la alteración neurológica primaria. Evidentemente la enferma estaba hipóxica, infectada y, probablemente, puede haber tenido algún factor depresor miocárdico si se acepta la existencia del mismo en los cuadros sépticos. Esto podría justificar inicialmente una alteración cardíaca. La paciente presentó siempre un tercer ruido, no explicable por el hematocrito bajo, exclusivamente, porque en algunas oportunidades el hematocrito era suficientemente alto como para que no lo tuviera. De modo tal que probablemente hubiera un componente miocárdico primario que produjera bradicardia y, secundariamente, una depresión del sistema nervioso, y por lo tanto un coma de tipo metabólico. A favor de esta explicación, el coma metabólico, está el hecho de la evolución del deterioro de sensorio en el último episodio que no fue excesivamente abrupta. El problema reside en encontrar en el presente coma metabólico algunos elementos estructurales claros, como el caso de la paciente: una anisocoria y una alteración conjugada de la mirada vertical. Evidentemente hay pocos comas metabólicos que sean capaces de alterar la motilidad ocular, porque en rigor una de las características de los co-

mas metabólicos es la indemnidad de esta motilidad ocular. Obviamente los comas más importantes que producen esa alteración son el hipoglucémico y el hipóxico. Así que si aceptamos la posibilidad de que la hipoxia haya sido la causa primaria del problema cerebral de la enferma, la lesión de tronco debe ser capaz de producir alteraciones en los movimientos oculares. Otra posibilidad sería que la enferma, en el momento en que hizo el coma, estuviera con una alteración de coagulación importante; en estos enfermos la muerte es causada no sólo por cuadros sépticos sino cuadros hemorrágicos. Si aceptamos la posibilidad de una alteración de coagulación, es probable que la enferma haya hecho una hemorragia inicial, con un cuadro que por la localización podría presumirse a nivel de mesencéfalo —porque tiene una anisocoria que puede corresponder a nivel pretectal— ya que tenía alteración de los movimientos verticales. Esta alteración de los movimientos verticales de los ojos habla de lesión mesencefálica y si los ojos se desvían hacia arriba, la lesión puede estar localizada en la región de la unión mesencéfalo-diencefálica (área prerrúbica); de todos modos, la enferma tiene dos posibilidades a nuestro criterio: una, que la paciente haya hecho inicialmente una hemorragia encefálica —una hipertensión endocraneana con bradicardia secundaria— y que luego, haya presentado el paro respiratorio que fue la causa de su muerte; la otra, que la enferma tuviera realmente una alteración hemodinámica muy severa, una hipoxia grave, una depresión miacárdica primaria, y presentara coma secundario a la depresión miocárdica. Las alteraciones neurológicas focales que se aprecian en el examen físico serían secundarias a una lesión de tronco. Una cosa más, aunque no neurológica, que quisiera agregar, es que existe la posibilidad de que independientemente de una franca bronconeumonía, tenga cierto grado de edema pulmonar, por la hipoalbuminemia y, además, independientemente de la presión venosa central, por la sepsis. Así que podría existir un componente de edema pulmonar o bien, no cardiogénico, o bien, cardiogénico, si aceptamos la posibilidad de insuficiencia cardíaca.

Dr. D. E. Bernasconi: Los huéspedes inmunológicamente comprometidos tienen particular tendencia a contraer infecciones pulmonares, la etiología de éstas es múltiple, en forma aislada o combinada, puede estar dada por bacterias, hongos, virus, micoplasmas, protozoarios, helmintos, etc. Es muy importante aislar el agente causal y muchas veces no es detectado por procedimientos no invasivos y por lo tanto es conveniente efectuar fibrobroncoscopía y biopsia transbronquial para poder obtener secreciones y tejido pulmonar para cultivo y examen histológico, dado que el tratamiento específico para el agente causal puede modificar en forma espectacular el cuadro. La supervivencia y la mejoría de estos enfermos corre en forma paralela a estas técnicas diagnósticas agresivas. No parece ser el caso de esta paciente ya que la secuencia es distinta. Ella empieza con una angina vinculada a la agranulositosis. (aislándose en el cultivo *Escherichia coli*) y después aparecen las imágenes pulmonares, éstas parecen ser en un primer momento compatibles con edema y después con una bronconeumonía. Como dijo el Dr. Benarroch, no se puede descartar que haya un componente mixto de edema pulmonar cardiogénico o no, ya que tenía varias condiciones tales como, sobrehidratación, uremia, shock prolongado, hipoalbuminemia. Otro aspecto para comentar es acerca de los gases en sangre, en los que se encontró en un primer momento acidosis metabólica con una PO_2 aceptable respirando aire, pero en los análisis siguientes se ve una acidosis mixta con una PO_2 muy baja con una fracción inspirada de 78 % que habla del compromiso importante de la difusión y de la relación ventilación/perfusión. En resumen coincidimos con el diagnóstico que se hizo en su oportunidad, que fue de bronconeumonía por gérmenes Gram negativos con el agregado de edema pulmonar.

Dr. E. Bullorsky: Creo que es interesante consignar el hecho de que a pesar de lo escrito en los últimos años sobre la trans-

fusión de leucocitos no se han difundido suficientemente las indicaciones de la misma. Esta paciente cumple con las condiciones estrictas que indican transfusión de leucocitos: 1) agranulocitosis, menos de mil blancos totales por mm³, menos de 500 neutrofilos por mm³, y 2) cuadro séptico reconocido. Desde las clásicas descripciones de transfusiones de leucocitos del año 68 en perros, infectados con bronconeumonía por gérmenes gram negativos han aparecido numerosos trabajos y, sin embargo, sólo en los últimos años se reconocen las complicaciones potenciales que se pueden presentar. Las más importantes y las más graves para los pacientes no son las sensibilizaciones a determinados antígenos HLA, sino las reacciones pulmonares. Tal es así, que distintas revisiones del año pasado recomiendan que en transfusión de leucocitos en huésped comprometido con un foco séptimo reconocido a nivel pulmonar, conviene estar atentos a la hipoxia y al incremento de la disnea; la explicación sería el depósito en la circulación pulmonar de leucoaglutininas o de trombos de leucocitos leucoaglutinados que obstruyen la circulación. Otro aspecto que quiero comentar es que si bien esta enferma recibió transfusiones de leucocitos con el aparato que disponemos en el Instituto, recientes trabajos han enfatizado el hecho que la recolección con este tipo de técnica no es del todo útil y que la cantidad que se obtiene no es la ideal. La capacidad macrofágica, la de migración y la diapedesis se encuentran disminuidas por este tipo de procedimientos tal es así que la mayor parte de los autores recomiendan otro procedimiento conocido como de filtrado continuo y posterior ultracentrifugación con aparatos del tipo Haemmonetics. Es importante consignar que si uno inicia una transfusión de leucocitos en un huésped comprometido, probablemente una sola transfusión de leucocitos no corrija el problema y que la indicación es una transfusión diaria. Creo de interés mencionar además que si bien lo más común en estos pacientes es la bronconeumonía por gérmenes gram negativos una posibilidad a tener en cuenta desde el comienzo es la sobreinfección por cándidas al punto que muchos autores recomiendan, precozmente, hacer contrainmunoelectroforesis y estudio de serología para candidiasis. Coincido con el doctor Kniznik en que probablemente encontremos úlceras en todo el tubo digestivo debido a la neutropenia. Por último, comentaba recién con la Dra. Molina que otro mecanismo teórico a tener en cuenta en la aplasia medular es la posibilidad de daño de la microcirculación de la médula ósea; justamente en estos casos, el cultivo de médula es útil porque esos son pacientes que tienen cultivos exitosos.

DR. J. MARCARIAN: Se nos consultó, cuando la enferma presentó el primer episodio de paro cardíaco. En los trazados electrocardiográficos se evidenciaba un síndrome taquicardia-bradicardia. Esta es una forma de presentación de la disfunción del nódulo sinusal, y en esta paciente hay por lo menos tres causas posibles para explicar la disfunción del nódulo sinusal. Una sería la pericarditis séptica, otra podría ser un embolismo arterial sinusual séptico y otra la administración previa de sales de litio, que pueden provocar disfunción sinusal. En cuanto a la insuficiencia cardíaca que podría tener la paciente, asociada a un cuadro séptico severo, no pudimos confirmarla. Está descripta varias veces en la historia la presencia de un 3er. ruido, pero en el momento de nuestra ascultación la paciente estaba taquicárdica y taquiarrítmica y no podemos asegurar la presencia del mismo. En cuanto a la posibilidad de un tromboembolismo de pulmón séptico, no había en este caso evidencias que lo sugirieran.

Discusión anatomopatológica

DRA. CLARISA ALVAREZ: La autopsia confirmó el diagnóstico clínico de aplasia medular. En todas las muestras de médula ósea que tenemos, hay ausencia completa de todos los elementos mieloides; no hay megacariocitos, ni elementos de la serie blanca ni de la serie roja. Quedan linfocitos y plasmocitos con abundantes hemorragias medulares. El hígado pesaba 1 900 g, la superficie externa era lisa. Histológicamente no se encontraron evidencias de

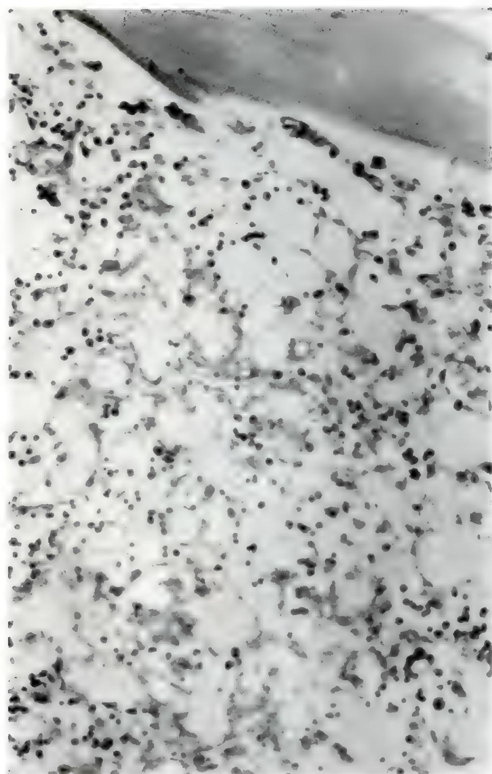


Fig. 1. — Aplasia medular.

hepatitis viral aguda en resolución. La arquitectura general del hígado estaba conservada, los espacios porta presentaban leve fibrosis sin infiltrados inflamatorios, la placa limitante era neta, el lobulillo estaba conservado. Había dilatación sinusoidal con necrosis centrolobulillar atribuible a isquemia. Por lo tanto, pensamos que la hepatitis viral había curado con restitución *ad integrum*. No se encontraron en la autopsia indicios de sepsis, ni tampoco lesiones de agranulocitosis. La paciente había desarrollado secundariamente a la aplasia medular, un cuadro de diátesis hemorrágica severa, con sufusiones múltiples en casi todos los órganos estudiados. Había hemorragias focales en miocardio, bazo, adrenal, en la mucosa del tracto digestivo, en endometrio, ovario. A nivel pulmonar la hemorragia fue masiva. Ambos pulmones estaban agrandados, de consistencia aumentada, la pleura era lisa. Al corte presentaban color rojo vinoso y aspecto consolidado. Se halló sangre en el interior de la tráquea y de los bronquios. Histológicamente se encontró una hemorragia pulmonar masiva reciente, con sangre ocupando todos los alvéolos. En algunos espacios alveolares había cierta organización con aisladas membranas hialinas; pero en general toda la lesión tenía la misma antigüedad y era reciente. Los riñones pesaban 220 g cada uno, estaban agrandados y edematosos con la superficie lisa y la corteza pálida. Histológicamente se encontró una necrosis tubular aguda. Había además una notoria infiltración inflamatoria intersticial, linfoplasmocitaria con el aspecto de una nefritis intersticial; probablemente tenga relación con la ingesta de litio que recibió la paciente. El SNC no fue estudiado, pero teniendo en cuenta la diátesis hemorrágica general, es muy probable que el cuadro cerebral se deba a una hemorragia cerebral.

Diagnóstico anatómico

Antecedente clínico de hepatitis viral aguda (3 meses antes de la muerte):

1) *Aplasia medular. Diátesis hemorrágica generalizada. Hemorragia pulmonar masiva bilateral. Sufusiones hemorrágicas múltiples (adrenal, miocardio, bazo, tracto digestivo, útero, etc.). Necrosis tubular aguda. Nefritis intersticial. Signos de shock: depleción de lípidos adrenales. Necrosis hepática centrolobulillar.*

2) *Colesterolosis vesicular.*

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 596-611 (1981)

PROFILAXIS CON ANTIBIOTICOS

A. A. GRECA, H. O. ALONSO

Departamento de Clínica Médica, Sanatorio Británico, Rosario

El uso profiláctico de agentes antimicrobianos ha sido motivo de controversia durante muchos años. Algunas indicaciones han sido casi universalmente aceptadas, mientras otras han dividido a la comunidad médica. Es por eso que la indicación y la utilidad de este procedimiento necesitan todavía ser aclaradas. En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios a fin de establecer sus ventajas y desventajas.

La finalidad de este trabajo es reseñar y discutir las aplicaciones más comúnmente aceptadas de este método tanto en el terreno de las enfermedades médicas como en el de la prevención de la infección en cirugía. Las medidas preventivas que no incluyen antibióticos (inmunizaciones, gamma-globulinas, etc.), no serán examinadas en profundidad por exceder el objetivo de esta revisión.

El desarrollo se ajustará al siguiente esquema:

I. *Profilaxis en enfermedades médicas.*

1. Endocarditis infecciosa.
2. Estreptococcias y fiebre reumática.
3. Meningococcias.
4. Huésped inmunológicamente comprometido.
5. Misceláneas.

II. *Profilaxis en cirugía.*

1. Cirugía intestinal electiva.
2. Traumatismos penetrantes del abdomen.
3. Cirugía sobre el tracto biliar .
4. Cirugía ginecológica y obstétrica.
5. Cirugía ortopédica y traumatológica.
6. Cirugía cardiovascular.
7. Cirugía torácica no cardíaca.
8. Cirugía urológica.
9. Neurocirugía.
10. Otros procedimientos.

— — — —

Recibido: 9-X-1980. Aceptado: 9-IX-1981.

Dirección postal: Sanatorio Británico, 2000 Rosario, Argentina.

I. Profilaxis en enfermedades médicas

1. *Endocarditis infecciosa:*

Debido a que la endocarditis infecciosa es una enfermedad asociada con una considerable morbimortalidad, su prevención es indudablemente recomendable. Pese a ser todavía insuficientes los estudios controlados en relación con el uso de antibióticos con sentido profiláctico[27, 57, 59] es generalmente aceptado que son útiles en pacientes "de alto riesgo" expuestos a situaciones que ocasionan bacteriemias transitorias.

Consideraremos "pacientes de alto riesgo" a los siguientes: *a)* portadores de prótesis valvulares; *b)* antecedentes de endocarditis infecciosa; *c)* cardiopatías congénitas. Se reconocen dos excepciones: el defecto del *septum secundum* y el *ductus* arterioso ligado (que raramente se infectan)[57]. En un estudio retrospectivo[84], sobre 125 pacientes con endocarditis infecciosa se observó que las cardiopatías congénitas (26 %) eran tan frecuentes como las reumáticas (27 %). Esto parece deberse a la disminución de la incidencia de la enfermedad reumática y a la clasificación de la estenosis aórtica aislada, más dentro de las cardiopatías congénitas que de las

reumáticas [44]; *d)* valvulopatías adquiridas: Pueden ser reumáticas, luéticas, arterioescleróticas o calcificadas (calcificación del anillo mitral o estenosis aórtica calcificada); *e)* estenosis subaórtica hipertrófica idiopática; *f)* prolapso valvular mitral: en los últimos años se lo ha reconocido como factor predisponente importante para endocarditis infecciosa. En una serie recientemente comunicada [18], el prolapso valvular mitral se encontraba en la tercera parte de 25 casos de insuficiencia mitral y endocarditis; *g)* casos especiales: en los pacientes portadores de marcapasos cardíacos, derivaciones ventrículo-atriales de líquidocefalorraquídeo, *shunts* arteriovenosos para hemodiálisis y canalizaciones venosas, el riesgo de endocarditis infecciosa es reducido (siempre que no haya patología endocárdica preexistente).

Las situaciones susceptibles de provocar bacteriemias transitorias son las siguientes [1, 57, 70]: *a)* patología odontológica: infecciones dentarias y procedimientos odontológicos de todo tipo. Los pacientes desdentados no dejan de estar expuestos al riesgo de endocarditis. Las úlceras provocadas por la mala adaptación de las prótesis son también fuente de bacteriemia [1]. El agente patógeno más frecuentemente involucrado en estos casos es el estreptococo *viridans; b)* procedimientos sobre el tracto respiratorio superior: adenoidectomía, tonsilectomía, broncoscopía (especialmente rígida), procedimientos quirúrgicos diversos que involucran la mucosa respiratoria. La flora bacteriana es similar a la de patología odontológica, por lo cual los regímenes antibióticos propuestos son similares (ver luego); *c)* cirugía del tracto digestivo: los patógenos más comunes son enterococos, gram negativos y bacteroides; *d)* manipulaciones urológicas: riesgo de bacteriemia por gram negativos; *e)* cirugía séptica o potencialmente séptica: se tratará este punto en *Profilaxis en cirugía; f)* cirugía cardíaca: en especial recambios valvulares y con menos énfasis cirugía coronaria. El patógeno más frecuente es el estafilococo *aureus;* (Ver luego *Profilaxis en cirugía*); *g)* casos especiales: la endocarditis bacteriana parece ser muy rara luego de partos normales, gastrocopías, punción hepática, proctosigmoidoscopía, enema baritada, examen ginecológico, curetaje uterino no infectado o manipulación de DIU, a pesar de las bacteriemias transitorias demostradas en estas situaciones. La profilaxis antibiótica, por lo tanto, se reservará para los pacientes portadores de válvulas protésicas [1].

La prevención de la endocarditis infecciosa, se basa en dos pilares: medidas generales y antibióticos.

a) Medidas generales: En el plano odontológico debe insistirse en la correcta higiene dentaria. Los lavados del surco gingival con soluciones antisépticas a presión pueden *per se* producir bacteriemia, debiendo hacerse siempre bajo protección antibiótica [1]. Se procurará esterilizar la orina antes de toda intervención urológica, si bien esto es a veces difícil de conseguir y el procedimiento debe realizarse, de todos modos, bajo cobertura con antibióticos. Para las endoscopías se preferirán los fibroscopios a los instrumentos rígidos. En caso de ser necesaria la intubación se elegirá la vía orotraqueal. Las perfusiones se administrarán en lo posible con agujas pequeñas, evitándose los catéteres. Son especialmente peligrosos aquellos catéteres ubicados dentro de las cámaras cardíacas. Se pondrá especial cuidado en la manutención de su esterilidad y se evitará el uso innecesariamente prolongado de los mismos. En los pacientes con indicación de cirugía cardíaca se indicará un examen odontológico varias semanas antes de la operación, para que los tratamientos que fuera necesario realizar puedan hacerse con suficiente anticipación, si ello fuese posible. Tales tratamientos se deberán hacer bajo cobertura antibiótica.

b) Antibióticos: Se prefieren regímenes parenterales, ya que con ellos se pueden obtener niveles plasmáticos más predecibles y seguros. Los regímenes comunicados en la literatura se basan en observaciones in vitro y en estudios en animales, debido a la inexistencia de estudios clínicos controlados [1, 27].

El esquema que sigue se basa en las recomendaciones de la *American Heart Association* [1] y en las aparecidas en *Medical Letter on Drugs and Therapeutics* [70]. Las dosis mencionadas deben adaptarse

para niños (intervalos entre dosis iguales que para adultos) y para pacientes con insuficiencia renal.

Procedimientos dentales y en el aparato respiratorio superior:

Vía parental/oral combinada: 1-2 millones de U de penicilina G acuosa IM más 600 000 U de penicilina G procaína * IM, 30 min a 1 h antes del procedimiento. Luego 500 mg de penicilina V (fenoximetil-penicilina cada 6 h hasta completar 8 dosis. Niños: penicilina G acuosa: 30 000 U/kg; penicilina G procaína 600 000 U; penicilina V: 250 mg c/6 h.

Alérgicos a penicilina: Una hora antes del procedimiento: 1 g de vancomicina * IV durante 30 min. (Niños: 20 mg/kg). Luego 500 mg de eritromicina oral c/6 h, hasta completar 8 dosis.

Vía oral: 2 gramos de penicilina V, 1 h antes del procedimiento y luego 500 mg c/6 h hasta completar 8 dosis.

Alérgicos a penicilina: Eritromicina 1 g (niños: 20 mg/kg) oral 1-2 h antes del procedimiento y luego 500 mg c/6 h hasta completar 8 dosis.

Para pacientes con válvulas protésicas: Penicilina G acuosa 1 millón de U IM (niños: 30 000 U/kg) más penicilina G procaína 600 000 U IM (niños: ídem) más estreptomicina 1 g IM (niños: 20 mg/kg); 30 min a 1 h antes del procedimiento. Luego: penicilina V: 500 mg (niños: 250 mg) c/6 h hasta completar 8 dosis.

Alérgicos a penicilina: Vancomicina * 1 g IV en infusión 30 min a 1 h antes del procedimiento. Luego eritromicina 500 mg c/6 h hasta completar 8 dosis. (Niños: eritromicina: 10 mg/kg, vancomicina: 20 mg/kg).

Notas: En los casos de trastornos en la cicatrización puede aumentarse el número de dosis, si bien la bacteriemia raramente persiste más de 15 minutos luego del procedimiento.

En los pacientes que reciben penicilina en forma continua para prevención secundaria de la fiebre reumática, pueden existir estreptococos *viridans* en cavidad oral resistentes a penicilina. Podrá elegirse para estos casos un régimen combinado o bien eritromicina oral.

* Los antibióticos así señalados no están en el mercado en nuestro país.

Procedimientos gastrointestinales y génito-urinarios:

Vía parental: Penicilina G acuosa IM o IV 2 millones de U (niños: 30 000 U/kg) o ampicilina IM o IV 1 g (niños: 50 mg/kg), gentamicina 1.5 mg/kg IM (no más de 80 mg) o estreptomicina 1 g IM (niños: 20 mg/kg). Dosis inicial 30 min a 1 h antes del procedimiento. Si se usa gentamicina repetir junto con penicilina o ampicilina cada 8 h dos veces más. Si se usa estreptomicina, repetir de la misma manera c/12 h dos veces más.

Alérgicos a penicilina: Vancomicina 1 g IV en 30 min (niños: 20 mg/kg), más estreptomicina 1 g IM (niños: 20 mg/kg), 1 h antes del procedimiento. Repetir ambos una vez 12 h más tarde.

Vía oral: 3.5 g de ampicilina más 1 g de probenecid, 1 a 2 h antes del procedimiento. Luego 15 mg/kg de ampicilina cada 6 h hasta completar 8 dosis. Además 1 g de estreptomicina IM, 1 h antes del procedimiento, a repetir 1 vez 12 h más tarde.

Alérgicos a penicilina: No son útiles regímenes orales que no incluyan penicilina o ampicilina.

Nota: Es válido lo dicho anteriormente para los casos en que hay trastornos en la cicatrización.

En aquellos casos en que los probables gérmenes en juego sean estafilococos o estreptococos (no enterococos) podrían indicarse esquemas que incluyan cefalosporinas orales o parentales en vista de su efectividad frente a tales agentes, lo cual las convierte en legítimas opciones cuando la penicilina está contraindicada [61, 89, 91].

2. *Estreptococcias y fiebre reumática:*

El 3 % de las anginas estreptocóccicas es seguido de episodios de fiebre reumática, por lo cual deberán tratarse adecuadamente estas infecciones para prevenir la fiebre reumática aguda. Esto se conoce como *prevención primaria* [2]. La droga de elección es la penicilina, pudiendo utilizarse una única inyección IM de penicilina benzatíni-

ca 1 200 000 U (niños: 600 000 U), o bien penicilina oral 200 000 o 250 000 U, 3 o 4 veces por día durante 10 días. Este esquema es recomendado también para contactos familiares, escolares y en cuarteles. En casos de alergia a penicilina, se elegirá eritromicina a razón de 250 mg por vía oral, 3 veces por día durante 10 días. Otros antibióticos han sido ensayados, no ofreciendo ventajas sobre los propuestos [55, 69, 81]. Las sulfamidas, que son útiles para la prevención secundaria (ver luego), no deben usarse para episodios agudos de faringitis estreptocóccica porque no erradican el germen. En casos de faringitis endémica, se debe instituir tratamiento antibiótico aun antes de tener resultados bacteriológicos en los siguientes casos: *a)* pacientes con historia de fiebre reumática previa que no reciben quimioprofilaxis; *b)* individuos jóvenes con historia familiar de fiebre reumática, y *c)* en la escarlatina [57].

No suele hacerse profilaxis para portadores asintomáticos del estreptococo [2, 27]. Se piensa que probablemente ésta sea una experiencia inmunizante para el sujeto, tal como ocurre con el meningococo [57].

En pacientes que han sufrido fiebre reumática, nuevas infecciones por estreptococo pueden desencadenar rebrotes. Es preferible la profilaxis antibiótica continua en estos casos, al tratamiento de cada episodio agudo. Se denomina a esto *prevención secundaria.* Los factores que avalan la necesidad de profilaxis son: *a)* el riesgo de daño valvular en los nuevos brotes aun cuando no haya habido compromiso cardíaco en el primer episodio; *b)* el riesgo de nuevos brotes disminuye con la edad y con el tiempo transcurrido entre el primer episodio y las reinfecciones por estreptococo; *c)* aumentan el riesgo los contactos medioambientales con estreptococo; *d)* la exposición a faringitis estreptocóccica en soldados, maestras, médicos, etc.; *e)* el riesgo es mayor cuanto menor es el nivel socioeconómico de los pacientes [57]. La duración de la profilaxis se discute, aunque se acepta que dependerá de cada caso en particular y que será siempre prolongada [2]. Como criterio general se puede decir que la profilaxis se prolongará 5 a 7 años en adultos y hasta los 21 años en niños. En casos de recambio valvular por valvulopatía reumática se extenderá la misma de por vida [57]

Los esquemas antibióticos propuestos para prevención secundaria son[2]: *a)* penicilina benzatínica 1 200 000 U IM cada 4 semanas (para pacientes de alto riesgo, como los que ya han tenido compromiso cardíaco); *b)* por vía oral: sulfadiazina 1 g una vez por día (niños: 0.5 g), penicilina 250 000 U dos veces por día, o bien *c)* eritromicina (para alérgicos a penicilina) 250 mg dos veces por día. Debe recordarse que los regímenes orales tienen mayor riesgo de recaída, y que están indicados para pacientes de bajo riesgo.

Profilaxis de la infección neonatal por estreptococo grupo B: La infección neonatal de inicio temprano por estreptococo grupo B se contrae por transmisión directa a partir de la madre colonizada por el microorganismo. El mecanismo de infección del neonato puede ser la transmisión intraútero o durante el paso por el canal del parto. Varios esquemas antibióticos se han ensayado con criterio preventivo. La mayoría incluyen penicilina [100] en el momento del nacimiento o ampicilina [116] al comienzo del trabajo de parto en las portadoras vaginales o rectales del estreptococo. No existen estudios hasta el presente que puedan establecer la recomendación definitiva de un esquema determinado. Se está investigando el papel de los anticuerpos maternos en relación con la infección neonatal [11] y se ha sugerido que la transferencia transplacentaria de anticuerpos maternos protegería al neonato de la infección. Esta sería la base para la inmunoprofilaxis cuya efectividad y seguridad aún no están demostradas [100].

3. *Meningococcias:*

Las indicaciones del uso de antibióticos para prevenir la enfermedad meningocóccica pueden esquematizarse de la siguiente manera: *a)* contacto directo con un caso activo (generalmente familiar); *b)* individuos expuestos al hacinamiento en contacto con un enfermo, y *c)* niños en *nurseries* donde ha habido un caso de meningococcia. No estaría indicada profilaxis en contactos menos estrechos como compañeros de escuela o de juegos y se

discute la indicación en caso de *carriers,* ya que este estado podría tener valor como factor inmunizante [57].

Debido a la resistencia observada en muchas cepas de meningococo para las sulfamidas se han examinado nuevos agentes, de los cuales sólo la minociclina y la rifampicina probaron ser efectivos [23, 57]. Las sulfamidas pueden seguir siendo de elección si se demuestra que la cepa en cuestión responde a este tratamiento. Algunos autores han sugerido la posibilidad de combinar sulfamidas y rifampicina [32] o rifampicina y minociclina [74]. Las dosis más comúnmente recomendadas son: *a)* rifampicina, 600 mg/día por vía oral durante 4 días o 600 mg cada 12 h durante 2 días [8, 27, 57]; *b)* minociclina, 100 mg cada 12 h por vía oral durante 5 días, y c) sulfadiazina (para gérmenes sensibles), 1 g cada 12 h por vía oral durante 2 días [57].

Otro elemento de valor en la prevención de la infección meningocóccica es la vacunación, que estaría indicada en casos de brotes epidémicos en un determinado grupo de población [74].

4. *Profilaxis antibiótica en el huésped inmunológicamente comprometido.*

El concepto de paciente inmunosuprimido incluye aquellos individuos que presentan desórdenes cualitativos y cuantitativos de los leucocitos o deficiencias de las inmunoglobulinas y del sistema de complemento. Los trastornos de las defensas pueden ser relacionados con la inmunidad humoral o celular. Según sea el caso aumentará la predisposición hacia un tipo particular de infección. En la Tabla 1 esquematizamos los procesos que cursan con inmunosupresión, las infecciones más comunes y sus agentes causales [29]:

Los pacientes inmunodeprimidos suelen tener defectos de la actividad fagocitaria, de la inmunidad celular o humoral en forma combinada.

En lo que respecta al manejo antibiótico, algunos autores sugieren esperar los

TABLA 1

Procesos que cursan con inmunosupresión	Infecciones más comunes	Agentes causales más comunes
Neutropenia: Leucosis agudas, citostáticos, anemias aplásticas, agranulocitosis. *Alteraciones cualitativas de los leucocitos:* Diabetes mellitus, artritis reumatoidea, terapia esteroidea, afecciones hereditarias (enf. granulomatosa crónica y sínd. de Chediak Higashi).	Celulitis, abscesos, faringitis, neumonía, bacteriemia.	Estafilococo, bacilos gram negativos.
Defectos de inmunidad celular: Hodgkin, sarcoidosis, uremia, cáncer avanzado, uso de citostáticos y esteroides, síndromes congénitos asociados con anormalidades del sistema T.	Hepatitis, infecciones cutáneas, neumonías, infecciones del SNC.	Listeria, mycobacterium, virus (herpes-varicela, citomegalovirus), cándida, toxoplasma, *Pneumocystis carinii.*
Defectos de inmunidad humoral: a) *Déficits de anticuerpos:* Mieloma, LLC, citostáticos, sínd. congénitos asociados a niveles bajos de inmunoglobulinas; b) *Déficits de complemento:* LES, anemia drepanocítica, síndromes hipocomplementémicos congénitos.	Sinusitis, neumonías, bacteriemias.	Neumococo, hemophilus y otros encapsulados, *Pseudomona aeruginosa.*

signos de alarma (en especial la fiebre) e instituir antibióticos de amplio espectro, previo cultivo para aerobios, anaerobios y hongos de sangre, orina, fauces, recto y lesiones de piel [10, 98]. En el paciente de alto riesgo asintomático pueden tomarse medidas con verdadero sentido preventivo. Durante mucho tiempo se atribuyó a la flora endógena un papel trascendente en estos pacientes y se indicó la administración oral de asociaciones antibióticas pobremente absorbibles [29, 59, 66, 88, 106, 115]. El esquema más usado es el GVN: gentamicina 200 mg, vancomicina 500 mg y nistatina 500000 U por vía oral c/6 h. Se observó reducción de la infección pero también intolerancia digestiva de magnitud. La indicación de estos regímenes sigue siendo controvertida. Ultimamente se ha dado jerarquía a la flora exógena y en especial al "germen de la casa" (infecciones nosocomiales). Para prevenirlas resulta importante restringir la indicación de procedimientos que predispongan a la infección (catéteres, sondas vesicales, hiperalimentación parenteral), evitar hospitalizaciones prolongadas y aislar a los pacientes probadamente infectados. Parece reducirse la incidencia de infecciones graves con el aislamiento de pacientes de alto riesgo en áreas de aire purificado por filtración y flujo laminar [13, 66, 115].

La profilaxis antibiótica por vía sistémica se sigue discutiendo debido a la aparición de gérmenes resistentes y oportunistas con la consiguiente dificultad en el tratamiento [29]. Ultimamente se ha enfatizado la efectividad del cotrimoxazol en dosis habituales. No se ha comunicado agravamiento del cuadro hematológico en pacientes granulocitopénicos [47]. La misma medicación se ha utilizado con éxito para la prevención de la neumonitis por *Pneumocysits carinii* a la dosis de 150 mg/m^2 de trimetoprima y 750 mg/m^2 de sulfametoxazol [53]. Otros esquemas pueden utilizarse, en especial aquellos basados en la flora propia de cada institución.

La utilidad de la inmunoterapia (gammaglobulina, vacunas anti neumococo, meningococo y *Pseudomona aeruginosa)* es motivo de interés [16, 59].

5. *Misceláneas:*

A continuación pasaremos revista brevemente a diversas situaciones en las que puede plantearse el empleo profiláctico de antibióticos.

a) *Infecciones por Hemophilus influenzae:* Se indicará cultivo de nariz y fauces de los contactos familiares de los enfermos, a fin de detectar portadores de *Hehophilus* tipo B. Se consideran "de alto riesgo" los contactos menores de 6 años de edad [99]. Los esquemas antibióticos recomendados son: ampicilina 50 mg/kg/día por 10 días [59], o 100 mg/kg/día por 5 días [38]. Recientemente se ha establecido que la rifampicina 20 mg/kg/día por 4 días [38, 99] probablemente sea más efectiva que la ampicilina.

b) *Oftalmía neonatorum:* Pueden hacerse instilaciones de nitrato de plata al 1 % con el riesgo de producir conjuntivitis química o instilaciones de penicilina (100 000 U/g). También puede usarse una inyección única de penicilina cristalina 50 000 U IM [59].

c) *Enfermedad estafilocóccica epidémica neonatal:* Frente a la aparición de epidemias de estafilococcia neonatal, debe hacerse profilaxis en *nurseries* donde ha habido casos hasta que la población de niños se haya renovado por lo menos dos veces. Se utilizará meticilina (100 mg/kg en dos o tres dosis IM/día), u oxacilina * (50 mg/kg/día oral). Los niños en que se demuestre por cultivo la presencia del germen recibirán el antibiótico por 10 días [59]. Estos antibióticos pueden eventualmente reemplazarse por cefalosporinas.

d) *Ruptura prematura de membranas:* En los recién nacidos en que se detecte líquido amniótico fuertemente sospechoso de estar infectado o cuya madre haya presentado franca amnionitis pueden recibir (previo cultivo de sangre, fosas nasales, faringe, piel y cordón umbilical) penicilina 60 000 U/kg y aminoglicósido en dosis convencional. En niños sin sospecha de infección se hará vigilancia estrecha sin administrar antibióticos [59].

e) *Diarreas coliformes en nurseries:* Cuando aparecen casos de diarrea neona-

tal por *Escherichia coli* enteropatógena en *nurseries*, todos los niños en contacto y los que ingresan recibirán neomicina 100 mg/kg/día, en tres a seis dosis diarias durante su estadía en el lugar. Siempre se harán cultivos antes de dar antibióticos. Si se tratara de una cepa resistente a neomicina, se dará colistín 15 mg/kg/día. Esta conducta se seguirá hasta que la población de la *nurserie* se haya renovado dos veces [59].

f) *Diarrea del viajero:* Afecta a numerosos turistas de países en vías de desarrollo. El lugar donde más se la ha estudiado es en México debido al importante flujo de turistas estadounidenses (tres millones anuales), sufriendo el 30 al 50 % episodios diarreicos. Ciertos países del Mediterráneo, Oriente Medio, Asia, Africa y Latinoamérica tienen esta enfermedad casi tan frecuentemente como México. El agente causal es la *Escherichia coli* enterotoxigénica. Se han ensayado para su prevención varios antibióticos como sulfamidas, sulfato de neomicina y doxiciclina, con numerosos efectos indesables y aparición de resistencia bacteriana. Ultimamente se ha propuesto una sustancia no antibiótica (subsalicilato de bismuto 60 ml/día en 4 tomas) con efectos colaterales despreciables. Se está buscando la dosis mínima útil [26, 43].

g) *Rinorrea y otorrea de LCR:* La fístula entre el espacio subaracnoideo y las fosas nasales o el oído predisponen a la meningitis bacteriana, especialmente a neumococo. Deberá controlarse a los pacientes, intentar la corrección quirúrgica y si ésta es imposible se podrá dar penicilina 200 000 U dos veces por día [59].

h) *Esplenectomizados:* En pacientes esplenectomizados (especialmente niños) son frecuentes la infecciones por neumococo (50 %), estreptococo grupo A, *Hemophilus influenzae*, meningococo, estafilococo y enterobacteriáceas. El riesgo es mayor cuando el bazo ha sido extraído por desórdenes hematológicos pero también en las esplenectomías post-traumáticas la incidencia de infecciones aumenta. El 80 % de los casos aparecen en los primeros dos años por lo cual en ese período se aconseja indicar penicilina 200 000 U dos veces por día [59]. Se ha postulado también la utilidad de la vacunación con polisacáridos polivalentes antineumococo, antihemophilus y antimeningococo [4, 7, 25, 63, 80].

i) *Otitis media recurrente:* Pueden hacerse bajas dosis de ampicilina o sulfametoxipiridazina pero se prefiere sulfisoxazol 0.5 g dos veces por día. Se hará profilaxis por uno a tres años ya que la susceptibilidad decrece con el transcurso del tiempo [59].

j) *Mieloma múltiple:* No existe acuerdo sobre el uso sistemático de antibióticos.

k) *Bronquitis crónica:* Diversos esquemas han sido propuestos para prevenir las exacerbaciones agudas invernales de la bronquitis crónica. Se pueden proponer entre otros tetraciclina 1 g/día en dos o cuatro dosis [59] o eritromicina 500 mg dos veces por día los primeros 10 días de cada mes durante el invierno [45]. También debe considerarse la inmunización (especialmente vacuna antineumocóccica) para estos pacientes.

l) *Insuficiencia cardíaca:* No hay acuerdo sobre el uso de antibióticos profilácticos, prefiriéndose el tratamiento enérgico de todo episodio agudo bronquial.

m) *Síndrome nefrótico:* No hay acuerdo en cuanto al uso de antibióticos.

n) *Infección urinaria recurrente e instrumentaciones del tracto urinario:* La infección urinaria recurrente en mujeres ocasiona cinco millones de consultas anuales en Estados Unidos [95, 103]. Se han utilizado con éxito los siguientes esquemas: trimetoprima-sulfametoxazol (40 mg/200 mg), trimetoprima (100 mg), nitrofurantoína en macrocristales (100 mg) [103]. Estas drogas son efectivas, bien toleradas y no generan cepas resistentes de *Escherichia coli* (el agente más común) pero aumentan la incidencia de otros patógenos. También puede utilizarse sulfametoxazol (500 mg) o la asociación mandelato de metenamina-ácido ascórbico (500 mg/500 mg) [95]. La duración de la profilaxis es de 6 meses. Si se produce recaída, se debe hacer profilaxis durante 2 años, luego de tratada la infección [95]. La profilaxis de la infección urinaria recurrente parece ser prefe-

rible desde el punto de vista económico al tratamiento de cada episodio agudo en las pacientes con episodios frecuentes de cistitis [104].

En lo referente a anormalidades e instrumentaciones del tracto urinario no existen suficientes estudios controlados que avalen el uso sistemático de antibióticos para nefrectomías, prostatectomías a cielo abierto o transuretrales y otros procedimientos urológicos [21]. En las operaciones ginecológicas los antibióticos parecen reducir la incidencia de infección urinaria cuando se dejan sondas vesicales entre uno y tres días en el post-operatorio [21]. Las anormalidades anatómicas se tratarán de corregir quirúrgicamente y se tratarán las infecciones demostradas bacteriológicamente [59].

ñ) *Gran quemado:* El uso sistemático de antibióticos ha generado la aparición de cepas resistentes (especialmente de estreptococo beta hemolítico luego de la administración de penicilina). Los antibióticos sistémicos con sentido profiláctico se reservarán para: *a)* niños con escaldaduras [112]; *b)* pacientes con gran compromiso respiratorio [112]; *c)* durante técnicas de autoinjerto [49, 112], y *d)* en el momento de debridar heridas [49, 112]. Se utilizará penicilina en sala de operaciones y luego durante dos días. Para alérgicos se podrá utilizar eritromicina. La elección de antibióticos dependerá en última instancia del tipo de germen más comúnmente hallado en quemados en esa unidad.

o) *Gonorrea:* Se discute la indicación de profilaxis luego de contactos potencialmente infectantes. Algunos autores no utilizan antibióticos si no hay infección demostrada [108]. Otros los consideran de valor en niños y adolescentes víctimas de abusos sexuales [51]. Hay diversos esquemas. Se puede proponer minociclina 200 ng orales luego del contacto [50].

II. Profilaxis en cirugía

El uso de agentes antimicrobianos es capaz de prevenir la infección de la incisión quirúrgica y la bacteriemia en pacientes seleccionados. Se ha demostrado en animales de experimentación [17] que la administración profiláctica de antibióticos para ser efectiva debe hacerse en el preoperatorio inmediato y en las primeras horas del postoperatorio. Son inefectivos los antibióticos dados varias horas después de la operación. Estudios clínicos [19, 86] han avalado este concepto. La duración de la profilaxis se puede establecer en aproximadamente 24 horas [19] con algunas variaciones según los casos (ver luego). Esta conducta hará minimizar los riesgos de toxicidad medicamentosa, de aparición de cepas resistentes, como así también el costo del tratamiento [97]. El cirujano no deberá descuidar las técnicas de asepsia y antisepsia y la meticulosa manipulación quirúrgica confiando en los antibióticos, teniendo presente el concepto de Wagensteen (citado por Spievack) [101]: "Los antibióticos podrán hacer que un cirujano de tercera categoría se vuelva de segunda, pero jamás lograrán que un cirujano de segunda se convierta en uno de primera categoría." Entre los cuidados a tener en cuenta se da especial importancia a la desinfección de la piel con soluciones antisépticas y al lavado de las manos [67].

En general los antibióticos tienen lugar cuando existe un alto riesgo de infección o cuando las consecuencias de la misma sean catastróficas.

1. *Preparación para cirugía intestinal electiva:*

Además de la utilización de dietas pobres en residuos y de enemas de limpieza, los antibióticos con criterio profiláctico se pueden indicar en base a tres modalidades: *a)* preparación preoperatoria del intestino con antibióticos por vía oral; *b)* antibióticos parenterales en el período perioperatorio, y *c)* vía tópica. En cuanto al uso de la vía oral se ha utilizado la asociación de neomicina (500 mg) y tetraciclina (250 mg) cada 6 horas durante los dos días previos a la operación, con resultados satisfactorios [111]. Otros autores tuvieron éxito con neomicina y eritromicina [78]. Estos antibióticos se usan relativamente poco para tratar infecciones en pacientes hospitalizados, por lo cual no existiría gran peligro en generar resistencia bacteriana

[110], ya que seguiría existiendo sensibilidad a los antibióticos habitualmente utilizados. Por vía oral también se ha utilizado el metronidazol [113] asociado a una dosis única de gentamicina IM [114] y el tinidazol asociado a tetraciclina IV [39]. Poco se conoce en cuanto a resistencia de especies de bacteroides a metronidazol [57]. Por vía parenteral los antibióticos más utilizados son las cefalosporinas [57, 64, 72, 85, 105]. Pese a que no se ha establecido la eficacia relativa de cada una de las cefalosporinas, la tendencia actual es usar los nuevos preparados semisintéticos como cefuroxime [84, 72] debido a su espectro ampliado, su estabilidad frente a las β-lactamasas de los aerobios gram negativos y a su actividad frente a algunas cepas de *Bacteroides fragilis*. Se lo ha utilizado solo (dosis única de 1.5 g IV) o asociado a metronidazole 0.5 g IV o un supositorio de 1 g) para cirugía rectocolónica. También se considera a las cefalosporinas de elección para cirugía gástrica y esofágica (sobre tercio inferior de esófago, cirugía gástrica en mayores de 50 años, por patología neoplásica o en cirugía de urgencia).

Otros antibióticos ensayados son: la asociación clindamicina-aminoglicósido [39], penicilina, meticilina y cloranfenicol [12], siendo muy discutible la indicación de este último antibiótico con sentido profiláctico. Con respecto a la vía tópica, se ha instilado la herida quirúrgica o el peritoneo con antisépticos o antibióticos como tetraciclinas y ampicilina [5, 40, 68, 94, 110]. Con respecto a la práctica de irrigación peritoneal, existen opiniones encontradas debido a que cantidades importantes de antibiótico se absorben desde este sitio con el riesgo de efectos colaterales [110].

2. *Traumatismos penetrantes del abdomen:*

Se trata de traumatismos contaminantes del peritoneo en la mayoría de los casos y el *Bacteroides fragilis* es el patógeno más común. Los regímenes antibióticos deberían incluir siempre clindamicina [22]. La dosis recomendada es 600 mg c/6 h y se aconseja asociarlo a aminoglicósidos en dosis habituales [107]. La duración del tratamiento se suele prolongar hasta 7 días, precisamente por tratarse de cirugía en área contaminada.

3. *Cirugía sobre el tracto biliar:*

Los pacientes considerados "de alto riesgo" en cirugía biliar son [20]: *a)* mayores de 70 años; *b)* ictericia obstructiva; *c)* litiasis canalicular sin ictericia, y *d)* colecistitis. Los antibióticos de elección para profilaxis son las cefalosporinas. El cefuroxime en el esquema antes señalado (ver "Cirugía intestinal electiva") se ha mostrado de utilidad [64]. Hacen falta nuevos estudios para establecer cuál es la mejor cefalosporina para utilizar en estos casos. No existiría indicación de profilaxis antibiótica para la colecistectomía no complicada en menores de 70 años [57].

4. *Cirugía ginecológica y obstétrica:*

El valor de la profilaxis en este tipo de cirugía ha sido discutido por diversos autores [24, 54, 101, 102]. El procedimiento más estudiado a este respecto es la histerectomía vaginal. Gérmenes aerobios y anaerobios colonizan el cérvix y los fondos de saco vaginales de mujeres sanas. Sin embargo, no siempre se correlaciona la flora obtenida por cultivo de los bordes vaginales con la flora responsable de las infecciones postoperatorias [57]. También aquí las cefalosporinas son los fármacos de elección [65, 71], en dosis única prequirúrgica. Otros agentes utilizados con similares resultados son: aminoglicósidos, penicilina y ampicilina [57]. Este último sería preferible en caso de raspado uterino en que es frecuente la aparición de infección por enterococo.

Para la histerectomía abdominal, algunos sugieren que la profilaxis antibiótica no tendría indicación precisa [46]. Se han ensayado con éxito, de todos modos las cefalosporinas [79] y el metronidazol [93]. Este último agente se usó para ambos tipos de histerectomía contra las infecciones por anaerobios.

En la cesárea, si bien el uso de antibióticos puede reducir la incidencia de infecciones [56, 92] existe el peligro de toxicidad neonatal por antibióticos, lo cual estaría en contra del uso profiláctico de los mismos [57].

5. *Cirugía ortopédica y traumatológica:*

Nos referiremos a la cirugía "limpia". En cuanto a las fracturas expuestas, en un

trabajo sobre 158 casos, se encontró un 70.3 % de cultivos positivos con predominio de cocos gram positivos [48]. Siendo el germen más común el estafilococo *aureus* los antibióticos de elección son las penicilinas resistentes a penicilinasa, la lincomicina o las cefalosporinas, asociadas a la limpieza y el debridamiento de la zona dañada [57].

El reemplazo total de cadera es un procedimiento que tiene una incidencia de infecciones relativamente alta (alrededor de 5 %) y de consecuencias graves, ya que a menudo requieren la remoción de la prótesis, hospitalización prolongada y dejan una incapacidad importante. Los gérmenes involucrados son generalmente los cocos gram positivos aunque las infecciones por bacilos gram negativos parecen estar aumentando su incidencia. Se han propuesto distintos esquemas con cefalosporinas [52, 82, 87], ya que se ha demostrado que con ellas se logran buenas concentraciones en plasma, hueso y cápsula articular de la cadera [82]. El antibiótico se administra en forma prequirúrgica inmediata y se prolonga por tiempo variable según los autores (12 h [87] hasta 5 días [52]). Las cefalosporinas también han sido utilizadas con éxito en otros procedimientos ortopédicos "limpios" [83]. Se han ensayado además antibióticos antiestafilococo (flucloxacilina +, cloxacilina +) [28, 87], con resultados similares a los de las cefalosporinas.

Además, se ha jerarquizado el valor de los ambientes estériles (flujo unidireccional, radiación ultravioleta) [33, 52, 73], en la prevención de la infección pero se piensa que las bacterias contaminantes del aire ambiente no son la vía de infección principal en este tipo de procedimiento.

Se ha utilizado la mezcla de antibiótico antiestafilococo con el cemento a colocar en la articulación [37] y se llegó a la conclusión de que los antibióticos conservan su actividad en el cemento polimerizado y que la misma decrece a lo largo de tres semanas. Los autores tabularon 1119 casos con una infección profunda.

También ha sido estudiada la instilación local de antibióticos en la herida quirúrgica. En un estudio sobre 466 pacientes instilando 100 cc de sulfato de neomicina al 0.1 % no se obtuvo reducción de los porcentajes de infección en hueso y partes blandas con o sin implantes metálicos [77].

6. *Cirugía cardiovascular.*

La infección en el corazón luego de la cirugía cardíaca, especialmente cuando involucra cuerpos extraños como válvulas protésicas, tiene desastrosas consecuencias. Tales infecciones son refractarias al tratamiento antibiótico hasta que es removido el foco. Por tal motivo infecciones que en otra localización serían banales son mortales en el corazón. La prevención es la única opción y mucho se ha escrito sobre cómo llevarla a cabo. La mayor parte de los regímenes tienden a erradicar el estafilococo, germen responsable de la mayoría de las infecciones [57]. Sólo tiene valor la profilaxis si existen en el suero del paciente niveles útiles de antibiótico en el momento en que el germen coloniza la válvula [30]. En un estudio con dos grupos de pacientes que recibieron cefalotina dos y seis días respectivamente, se estableció que si bien es útil la administración de antibióticos, no tiene justificativo prolongarla [41]. Otros autores [42], utilizando la asociación penicilina-estreptomicina y oxacilina en dos grupos de pacientes, observaron que los antibióticos no alteraron la incidencia de infección. Es de destacar que el grupo placebo de este trabajo debió ser eliminado cuando dos pacientes hicieron endocarditis a neumococo. Se han hecho estudios comparativos con cefalotina y meticilina + en cirugía a corazón abierto [76] y en cirugía de *by-pass* aorto-coronario [35]. En el primero se obtuvieron mejores resultados con la cefalosporina y en el segundo no se observaron diferencias significativas entre los dos antibióticos.

En cuanto a la endocarditis post-protésica es habitual distinguir dos variedades que se diferencian netamente en cuanto a su cuadro clínico, sus agentes causales y su pronóstico. La endocarditis que se produce en los dos primeros meses que siguen a la cirugía tiene un 63 a 88 % de mortalidad, mientras que la de comienzo tardío sólo tiene un 25 a 40 % [44]. Se ha dicho que los gérmenes productores de endocarditis temprana son generalmente resistentes a los antibióticos administrados

para profilaxis. En un estudio [84] se observó que un grupo de pacientes que habían recibido meticilina-estreptomicina desarrollaron infecciones por gram negativos y otros pacientes que recibieron cefalotina-colistín tuvieron enterococos. Otro trabajo [96] evaluó dos grupos de pacientes que recibieron ampicilina-meticilina o cefalotina. En el primero de 11 bacteriemias, 8 eran sensibles a los antibióticos utilizados en la profilaxis y en el segundo sólo 2 de 13 bacteriemias se debieron a gérmenes sensibles a los antibióticos. Esto se relacionó con el momento en que se obtuvieron las muestras. Los gérmenes del segundo grupo se aislaron en el séptimo día, mientras que los del grupo I se obtuvieron 94 días después de la operación. En la endocarditis tardía (luego de dos meses) los gérmenes más comunes son estreptococo *viridans* y bacilos gram negativos [34].

En la cirugía a corazón abierto se puede recomendar el uso de una cefalosporina durante 24 horas desde el preoperatorio inmediato. En las instituciones en que los gram negativos son importante causa de endocarditis post-operatoria, se puede adicionar un aminoglicósido durante 24 horas [34]. Se discute la necesidad de profilaxis antibiótica en procedimientos a corazón cerrado.

En cuanto a la cirugía vascular periférica, siendo el estafilococo *aureus* el patógeno más frecuente, parecería indicada la profilaxis durante 24 horas con cefalosporinas asociadas a adecuada antisepsia cutánea [34, 60].

7. *Cirugía torácica no cardíaca.*

Algunos autores [109] en estudio prospectivo doble ciego no encontraron reducción de la incidencia de infecciones mediante el uso de antibióticos (cefalosporinas) y tuvieron un elevado índice de efectos colaterales. Otros autores [34] tampoco recomiendan el uso de profilaxis antibiótica en cirugía de este tipo.

8. *Cirugía urológica.*

En pacientes con orina estéril en el momento de la operación, existe un riesgo de bacteriemia del 10 % y de bacteriemia con sintomatología clínica del 3 %. Este riesgo no parece reducirse con el uso de antibióticos [34]. La irrigación de la vejiga con una solución antimicrobiana puede prevenir la infección en enfermos cateterizados por menos de diez días [70]. En los pacientes que serán sometidos a prostatectomía se intentará esterilizar la orina antes de la operación. Si esto no fuese posible por la existencia de obstrucción o de una sonda vesical a permanencia, se deberá instituir profilaxis antibiótica en el período perioperatorio [34]. En una revisión de la literatura inglesa entre 1950 y 1978 [21] se encontraron estudios controlados en que se comunica éxito con la asociación cotrimoxazole-kanamicina o nitrofurantoína-kanamicina. Para diversos procedimientos transuretrales se ha utilizado ampicilina, amoxicilina o cefalexina con buenos resultados. Los autores de la revisión antes mencionada concluyen que faltan estudios controlados como para recomendar esquemas antibióticos definidos en prostatectomías (a cielo abierto o endoscópica), otros procedimientos transuretrales y nefrectomías.

9. *Neurocirugía.*

Se suelen emplear antibióticos en caso de operaciones prolongadas, con grandes áreas de espacio muerto o de hueso sin vitalidad o cuando se insertan derivaciones ventriculares en hidrocefálicos [70]. Se han ensayado antibióticos como clindamicina (que no penetra adecuadamente en el LCR y además tiene un estrecho espectro) y rifampicina (que rápidamente desarrolla resistencia). Se necesitan nuevos estudios controlados para evaluar la validez de estos y otros esquemas antibióticos [34].

10. *Otros procedimientos.*

Generalmente no se recomienda profilaxis antibiótica para la cirugía de la cabeza y el cuello, en especial otorrinolaringológica que no penetre en el orofárinx [34]. Para el cateterismo cardíaco y la inserción de marcapasos, si bien se han comunicado complicaciones infecciosas [15], éstas son raras y no parecen justificar la administración de antibióticos [70]. Ocurre algo similar para la sigmoidoscopía, la punción arterial, la toracocentesis o la paracentesis [70].

En cuanto a la cirugía "sucia" (en área

infectada), como la que se practica en la apendicitis perforada o en las fracturas expuestas, la infección post-operatoria es frecuente. La indicación de antibióticos es primordialmente terapéutica y debe hacerse por más tiempo que en profilaxis. La elección del medicamento depende del sitio de infección y de los posibles agentes contaminantes [70]. En la Tabla 2, tomada de *Medical Letter on Drugs and Therapeutics* [70], se esquematizan los criterios de profilaxis antibiótica en pacientes operados. Las dosis deben adaptarse para niños o pacientes con función renal anormal.

Comentario final

Los antibióticos utilizados con criterio preventivo en casos seleccionados son capaces de reducir la morbimortalidad por enfermedades infecciosas, la estadía hospitalaria de los pacientes y el costo del tratamiento [90, 110]. Sin embargo deberá tenerse en cuenta que los agentes antimicrobianos no están exentos de efectos secundarios a veces graves [3] y en especial que su uso inapropiado o innecesariamente prolongado es capaz de generar resistencia bacteriana. Diversos autores [6, 14, 31, 56, 58, 62, 75] han lla-

Tabla 2

Naturaleza de la intervención quirúrgica	Patógenos probables	Medicamentos recomendados	Dosis para adultos que se administra una o dos horas antes de la operación	Duración
Estéril				
Cardiovascular Prótesis valvulares	Estafilo *aureus* y epidermis, difteroides, bacilos entéricos gram (—), hongos	Penicilina resistente a penicilinasa o cefalosporina	1 g c/4 h IV 1 g c/4-8 h IV o IM	24 horas
Ortopédica Reemplazo total de cadera	Estafilo *aureus*	Penicilina resistente a penicilinasa o cefalosporina	1 g c/4 h IV 1 g c/4-8 h IV o IM	24 horas
Contaminada				
Tracto biliar	Bacilos entéricos gram (—), estreptococo grupo D	*Sólo para enfermos de alto riesgo* Cefalosporina o ampicilina con o sin gentamicina	1 g c/4-8 h IV-IM 1 g c/4 h IV 1.5 mg/kg c/8 h IM	24 horas
Intestinal	Bacilos entéricos gram (—), anaerobios, estrepto D	*Parenteral:* Cefalosporina o ampicilina más gentamicina con o sin Clindamicina *Oral:* Neomicina más eritromicina	1 g c/4-8 h IV-IM 1 g c/4 h IV 1.5 mg/kg c/8 h IM 600 mg c/8 h IV-IM	24 horas
Histerectomía Vaginal	Bacilos entéricos gram (—), anaerobios, estrepto D	Cefalosporina o ampicilina más gentamicina con o sin clindamicina	1 g c/4-8 h IV-IM 1 g c/4 h IV 1.5 mg/kg c/8 h IM 600 mg c/8 h IV-IM	24 horas
Infectada				
Ruptura de vísceras (esp. abdominales)	Bacilos entéricos gram (—), anaerobios, estrepto D	Ampicilina más gentamicina con o sin clindamicina	1 g c/4 h IV 1.5 mg/kg c/8 h IM 600 mg c/8 h IV-IM	5-10 días
Herida traumática	Estafilo *aureus* Estrepto A, *clostridium*	Penicilina resistente a penicilinasa o cefalosporina	1 g c/4 h IV 1 g c/4-8 h IV-IM	5-10 días

mado la atención sobre este problema que constituye el más complejo que enfrenta la infectología moderna. La profilaxis de la infección no se basa solamente en el empleo de antibióticos sino también en la depuración de técnicas quirúrgicas, en la observación de reglas de asepsia y antisepsia y en la supresión de instrumentaciones innecesarias. El médico debe tener en claro el concepto de Bradley Sack [14]: "La profilaxis antibiótica aun cuando sea exitosa es en el mejor de los casos una medida transitoria que deberá ser reemplazada rápidamente por técnicas ecológicamente menos peligrosas. Hasta que tales técnicas estén disponibles deberá limitarse el uso profiláctico de antibióticos a situaciones bien definidas en que no puedan lograrse los mismos fines por otras vías evitando su uso por simple conveniencia. Antes de indicar un antibiótico para prevenir la enfermedad el médico debe calibrar los riesgos para la comunidad tanto como para el individuo. Los esfuerzos para una educación médica difundida en cuanto al uso de antibióticos parece ser esencial en nuestra época de rápidos y globales traslados de las personas y de sus microbios."

Bibliografía

1. AHA Committee on Prevention of Bacterial Endocarditis: Prevention of Bacterial Endocarditis. *Circulation* 56: 1, 139 A, 1977.
2. AHA Commitee on Prevention of Rheumatic Fever: Prevention of Rheumatic Fever. *Circulation* 55: 1, 1977.
3. Altman LC, Tompkins LS: Toxic and allergic manifestations of antimicrobials. *Post Med* 64: 157, 1978.
4. Amman A, Addiego J, Wara D, Lubin B, Byron Smith W, Metzner W: Pneumococcal inmunization in sickle cell anemia and asplenia. *N Engl J Med* 297: 897, 1977.
5. Andersen B, Komer B, Ostergaard BH: Topical ampicillin against wound infection after colorectal surgery. *Ann Surg* 176: 129, 1972.
6. Appelbaum PC, Bhamnjee A, Scragg JN, Hallet AF, Bowen A, Cooper R: Streptococcus pneumoniae resistant to penicillin and cloramphenicol. *Lancet* 2: 995, 1977.
7. Appelbaum PC, Shaikh BS, Widome MD, Gordon RA, Austrian R: Fatal pneumococcal bacteriemia in a vaccinated splenectomized child. *N Engl J Med* 300: 203, 1979.
8. Arstein M: Chemoprophylaxis of meningococcal carriers. *N Engl J Med* 281: 678, 1969.
9. Arstein M: Prophylaxis for meningococcal disease. *JAMA* 231: 10, 1035-1037, 1975.
10. Atkinson K, Kay HEM, Mc Elwain TJ: Fever in the neutropenic patient. *Br Med J* 3: 160, 1974.
11. Baker CJ, Kasper DL: Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N Engl J Med* 294: 753, 1976.
12. Bernard HR, Cole WR: The prophylaxis of surgical infection: the effect of prophylactic antimicrobial drugs on the incidence of infection following potentially contaminated operations. *Surg* 56: 151, 1964.
13. Bodey GP, Hart H, Freireich EJ, Frei E: Studies of a patient isolator unit and prophylactic antibiotics in cancer chemotherapy. *Cancer* 22: 1018, 1968.
14. Bradley Sack R: Prophylactic antibiotics? The individual versus the community. *N Engl J. Med* 300: 1107, 1979.
15. Bryan C, Sutton J, Saunders D, Longaker D, Smith C: Endocarditis related to transvenous pacemakers: syndromes and surgical implications. *J Thor Cardiovasc Surg* 75: 758, 1978.
16. Burge PS, Richards JD, Thompson DS, Prankerd TAJ, Sare M, Wright P: Quality and quantity of survival of acute myeloblastic leukemia. *Lancet* 621, 1975.
17. Burke JF: The effective period of preventive antibiotic action in experimental incisions and dermal lesions. *Surg* 50: 161, 1961.
18. Corrigall D, Bollen J, Hancock EW: Mitral valve prolapse and infective endocarditis. *Am J Med* 63: 215, 1977.
19. Crossley K, Couch Gardner L: Antimicrobial prophylaxis in surgical patients. *JAMA* 245: 722, 1981.
20. Chetlin SH, Elliot DW: Preoperative antibiotics in biliary surgery. *Arch Surg* 107: 319, 1973.
21. Chodak G, Plant ME: Systemic antibiotics for prophylaxis in urologic surgery: a critical review. *J Urol* 121: 695, 1979.
22. Chow A, Ota J, Guze L: Clindamycin plus gentamycin as preventive therapy for aerobic and anaerobic infections. *CMA Journal* 115: 1225, 1976.
23. Deal W, Sanders E: Efficacy of rifampin in treatment of meningococcal carriers. *N Engl J Med* 281: 641, 1969.
24. Dellinger P: *Surg Gynec Obst* 148: 92, 1979.
25. Donaldson S, More M, Rosenberg S, Vosti K: Post-splenectomy bacteriemia among patients with and without lymphoma. *N Engl J Med* 287: 69 1972.
26. Dupont HL, Sullivan P, Evans DG, Pickering LK, Evans DJ, Vollet JJ, Ericsson CD, Ackermann PB, Tjoa WS: Prevención de la diarrea del viajero (enteritis del turista). *JAMA* (en Argentina) 2: 175, 1980.
27. Durack D: Chemoprophylaxis of bacterial endocarditis. *N Engl J Med* 292: 1080, 1975.
28. Ericson D, Ledgren L, Lindberg L: Cloxa-

cillin in the prophylaxis of post-operative infections of the hip. *J Bone Joint Surg* 55 A: 808, 1973.
29. Featherstone H, Dale E: Managing infections in immunosuppressed patients. *Post Med* 64: nº 3, 1978.
30. Feketty FR, Cluff LE, Sabiston D: A study of antibiotic prophylaxis in cardiac surgery. *J Thor Cardiovasc Surg* 57: 757, 1969.
31. Finland M: And the walls come tumbling down: More antibiotic resistance, and now the pneumococcus. *N Engl J Med* 299: 770, 1978.
32. Finley RA: Prophylaxis against meningococcal disease. *JAMA* 236: 459, 1976.
33. Fitzgerald R, Bechtol C, Eltkhar N, Nelson P: Reduction of deep sepsis after total hip replacement. *Arch Surg* 114: 803, 1979.
34. Flynn N, Lawrence R: Antimicrobial prophylaxis. *Med Clin N Amer* 63: 1225, 1979.
35. Fong I, Baker CE, Mc Kee D: The value of prophylactic antibiotics in aorta-coronary by-pass operations. A randomized double-blind study. *J Thor Cardiov Surg* 908, 1979.
36. Gall S: The efficacy of prophylactic antibiotics in cesarean section. *Am J Obst Gynec* 134: 506, 1979.
37. Gardner ADH, Medcraft JW: Antibiotic/bone cement mixtures in prevention of infection following total joint replacement. *Lancet* 7885: 891, 1974.
38. Gessert C, Granoff DM, Gilsdorf J: Comparison of rifampin and ampicilin in day care Center contacts of Haemophilus influenzae type B disease. *Pediatrics* 66: 1, 1980.
39. Giercksky KE, Flugesang J, Christiansen E, Johnson JA, Bergan T: Short-term chemotherapeutic prophylaxis in gastrointestinal operations. *Surg Gynec Obst* 151: 349, 1980.
40. Gilmore OJA, Martin TDM, Fletcher BN: Prevention of wound infection after appendicectomy. *Lancet* 1: 220, 1973.
41. Goldman DA, Hopkins CC, Karchmer KW: Cephalotin prophylaxis in cardiac valve surgery. *J Thor Cardiovasc Surg* 73: 470, 1977.
42. Goodman J, Schafner W, Collins H, Battersby E, Glenn Koenig M: Infection after cardiovascular surgery. *N Engl J Med* 278: 117, 1968.
43. Gorbach S: Cómo evitar viajar con escherichia coli. *JAMA* (en Argentina) 2: 216, 1980.
44. Gregoratos G, Karliner J: Infective Endocarditis. Diagnosis and management. *Med Clin N Amer* 63: 173, 1979.
45. Grob PR, White E, Gargan MB, Gibbs FJ: The use of erythromycin as prophylaxis in chronic bronchitis: a cohort study from general practice. *J Int Med Res* 8 (Supp 2): 47, 1980.
46. Grossman JH, Greco TP, Minkin MJ, Adams RL, Herholzer WJ, Andriole VT: Prophylactic antibiotics in gynecologic surgery. *Obst Gynec* 53: 537, 1979.
47. Gurwith M, Brunton J, Lank B, Harding G, Ronald A: A prospective controlled investigation of prophylactic trimethoprim/sulfamethoxazole in hospitalized granulocitopenic patients. *Am J Med* 66: 248, 1979.
48. Gustilo R: Use of antimicrobials in the management of open fractures. *Arch Surg* 114: 805, 1979.
49. Haburch D, Pruitt B: Empleo de antibióticos por vía general en el paciente quemado. *Clin Med N Amer* 6: 1140, 1978.
50. Harrison W, Hooper R, Wiesner P, Campbell A, Karney W, Reynolds G, Jones O, Holmes K: Minocycline given after exposure to prevent gonorrhea. *N Engl J Med* 300: 1074, 1979.
51. Herjanik B, Wilbois RP: Sexual abuse of children: detection and management. *JAMA* 239: 331, 1978.
52. Hill C, Flamant R, Mazas F, Evrard J: Prophylactic cefazolin versus placebo in total hip replacement. *Lancet* 8224: 795, 1981.
53. Hughes W, Kuhn S, Chaudhary S, Feldman S, Verzosa M, Aur R, Pratt C, George S: Successful chemoprophylaxis for pneumocystis carinii pneumonitis. *N Engl J Med* 297: 1419, 1977.
54. Hunt T: *Surg Gynec Obst* 148: 92, 1979.
55. Jackson H: Prevention of Rheumatic Fever. *Clin Pediatrics* aug 1973.
56. Jacobs MR, Kornhof HJ, Robbins-Brown RM, Stevenson CM, Vermaak ZA, Freiman I, Bennie Miller G, Witcomb MA, Isaacson M, Ward JI, Austrian R: Emergence of multiple resistant pneumococci. *N Engl J Med* 299: 735, 1978.
57. Jacoby I, Mandell L, Weinstein L: The chemoprophylaxis of infection. A brief review of recent studies. *Med Clin N Amer* 62: 1083, 1978.
58. Jessen O, Rosendal K, Bülow P, Faber V, Riewetts Eriksen K: Changing staphylococci and staphylococcal infection. *N Engl J Med* 281: 627, 1969.
59. Kagan B: Antimicrobial Therapy. Second Edition. Saunders. Philadelphia. London, Toronto, 1974.
60. Kaiser L, Clayson K, Multherin J, Roach A, Allen T, Edwards W, Dale A: Antibiotic prophylaxis in vascular surgery. *Ann Surg* 283, 1978.
61. Kay D, Hewitt W, Kenington J, Twick M: Cefazolin and staphylococcus endocarditis. *JAMA* 237: 24, 1977.
62. Kaiser EH: Methicillin resistant staphylococci. *Lancet* 7936, 1975.
63. Kyong K, Reynes HD: Hemophilus influenzae sepsis in a splenectomized child. *N Engl J Med* 301: 271, 1979.
64. Lambert WG, Mullinger BM: Single dose cefuroxime in the prophylaxis of abdominal wound sepsis. *Cur Med Res and Op* 6: 404, 1980.
65. Ledger WJ, Sweet RL, Headington JT: Prophylactic cephaloridine in the prevention of post operative pelvic infections in premenopausal women undergoing vaginal hysterectomy. *Am J Obst Gynec* 123: 442, 1975.
66. Levine A, Siegel S, Schreiber A, Hauser J, Preisler H, Goldstein I, Seidler F, Simon R,

Perry S, Bennett J, Henderson E: Protected environments and prophylactic antibiotics. *N Engl J Med* 288: 477, 1973.

67. Lilly HA, Lowbury EJL, Wilkins MD: Limits to progressive reduction of resident skin bacteria by disinfection. *J Clin Pat* 32: 382, 1979.

68. Longland CJ, Gray JC, Lees W, Garret JAM: The prevention of infection in appendicectomy wounds. *Br J Surg* 58: 117, 1971.

69. Massel BF: Prophylaxis of streptococcal infections and rherumatic fever. *JAMA* 241: 1589, 1979.

70. Medical Letter on Drugs and Therapeutics (versión española por la Organización Panamericana de la Salud): Profilaxis antimicrobiana. Profilaxis de la endocarditis bacteriana. Junio, 1977.

71. Mickal A, Curole D, Lewis C: Cefoxitin sodium: double blind vaginal hysterectomy prophylaxis in premenopausal patients. *Obst Gyn* 56: 222, 1980.

72. Mitchell NJ, Evans DS, Pollock D: Preoperation single dose cefuroxime antimicrobial prophylaxis with and without metronidazole in elective gastrointesttinal surgery. *J Antimic Chem* 6: 393, 1980.

73. Moggio M, Goldner L, Mc Collum D, Beissonger S: Wound infections in patients undergoing total hip arthroplasty: ultraviolet light for the control of airborne bacteria. *Arch Surg* 114: 815, 1979.

74. Monterola AC: Epidemiología de las infecciones meningocóccicas. *Rev Hosp Niños (Bs Aires)* 18: 72, 1976 .

75. Murray B, Moellering R: Patterns and mechanism of antibiotic resistance. *Med Clin N Amer* 62: 899, 1978.

76. Myerowitz PD, Caswell K, Lindsay WG: Antibiotic prophylaxis for open heart surgery. *J Thor Cardiov Surg* 73: 625, 1972.

77. Nachamie BA, Siffert RS, Bryer M: A study of neomycin instillation into orthopedic surgical wounds. *JAMA* 204: 687, 1968.

78. Nichols RL, Broido P, Condon RE: Effect of preoperative neomycin-erythromycin intestinal preparation on the incidence of infectious complications following colon surgery. *Ann Surg* 178: 453, 1973.

79. Ohm MJ, Galask RP: The effect of antibiotic prophylaxis in patients undergoing total abdominal hysterectomy. I. Effect on morbidity. *Am J Obst Gynec* 123: 442, 1975.

80. Overtur GD, Field R, Edmonds R: Death from type 6 pneumococcal septicemia in a vaccinated child with sickle cell disease. *N Engl J Med* 300: 143, 1979.

81. Parrillo J, Borst G, Mazur M, Iannim P, Klempner M, Moellerin R, Anderson S: Endocarditis due to resistant viridans streptococci during oral penicillin chemoprophylaxis. *N Engl J Med* 300: 296, 1979.

82. Parsons RL, Beavis JP, Jill A, Davi D, Paddock GM, Trounce JR: Plasma, bone, hip capsule and drain fluid concentrations of cefazolin during total hip replacement. *Br J Clin Pharm* 5: 331, 1978.

83. Pavel A, Smith RL ,Ballard A: Prophylactic antibiotics in clean orthopedic surgery. *J Bone Joint Surg* 56: 777, 1974.

84. Pelletier LL, Petersdorf RG: Infective endocarditis. A review of 125 cases from the University of Washington Hospitals 1963-1972. *Medicine* 56: 287, 1977.

85. Polk HC, López Mayor JF: Post operative wound infection: A prospective study of determinant factors and prevention. *Surg* 66: 1, 97, 1969.

86. Polk HC, Trachtenberg L, Finn M: Antibiotic activity in surgical incisions. *JAMA* 244: 1353, 1980.

87. Pollard JP, Hughes SPF, Scott JE, Evans MJ, Benson MKD: Antibiotic prophylaxis in total hip replacement. *Br Med J* 1: 707, 1979.

88. Preisler H, Goldstein I, Henderson E: Gastrointestinal "sterilization" in the treatment of patients with acute leukemia. *Cancer* 26: 1076, 1970.

89. Quinn E, Pohold D, Madhavan T, Burck K, Fischer E, Cox F: Clinical experience with cefazolin and other cephalosporins in bacterial endocarditis. *J Infect Dis* 128 (suppl), 1973.

90. Recco RA, Gadstone JL, Friedman SA, Gerken EH: Control antibiótico en un hospital municipal. *JAMA* (en Argentina) 241: 2283, 1979.

91. Reinarz J, Kier C, Guckian J: Evaluation of cefazolin in the treatment of bacterial endocarditis and bacteriemia. *J Infect Dis* 128 (suppl): 1973.

92. Rehu M, Jahkola M: Prophylactic antibiotics in cesarean section: effect of a short preoperative course of benzyl penicillin or clindamycin plus gentamycin on postoperative infectious morbidity. *Ann Clin Res* 12: 45, 1980.

93. Report by a study group: Metronidazole in the prevention and treatment of bacteroides infections in gynecological patients. *Lancet* 7896: 1540, 1974.

94. Rodeheaver GT, Ryes DG, Rust R: Mechanisms by which proteolytic enzymes prolong the golden period of antibiotic action. *Am J Surg* 136: 319, 1978.

9'. Ronald AR, Harding GKM: Urinary infection prophylaxis in women. *Ann Int Med* 94: 268, 1981.

96. Sande M, Johnson W, Hook E, Kaye D: Sustained bacteriemia in patients with prosthetic cardiac valves. *N Engl J Med* 286: 1067, 1972.

97. Schapiro M, Townsend T, Rosner B, Kass E: Use of antimicrobial drugs in general hospitals. Patterns of prophylaxis. *New Engl J Med* 301: 351, 1979.

98. Schimpff SC: Therapy of infection in patients with granulocitopenia. *Med Clin N Amer* 61: 1101, 1977 .

99. Shapiro ED, Wald ER: Efficacy of Rifampin in eliminating pharyngeal carriage of haemophilus influenzae type B. *Pediatrics* 66: 5, 1980.

100. Siegel JD ,Mc Cracken GH, Threlkeld N,

Milvenan B, Rosenfeld CR: Single-dose penicillin prophylaxis against neonatal group B streptococcal infections. *N Engl J Med* 303: 54, 1980.

101. Spievack A: The prophylactic antibiotic puzzle. *Surg Gynec Obst* 147: 80, 1978.
102. Spievack A: *Surg Gynec Obst* 148: 92, 1979.
103. Stamm WE, Counts GW, Wagner KF, Martin D, Gregory D, Mc Kevitt M, Tuck M, Holmes KK: Antimocrobial phophylaxis of recurrent urinary tract infections. *Ann Int Med* 92: 770, 1980.
104. Stamm WE, Mc Kevitt M, Counts GW, Wagner KF, Turck MH, Holmes KK: Is antimicrobial prophylaxis of urinary tract infections cost effective? *Ann Int Med* 94: 268, 1981.
105. Stone HH, Hooper CA, Kolb ID: Antibiotic prophylaxis in gastric, biliary and colonic surgery. *Ann Surg* 184: 443, 1976.
106. Storring RA ,Mc Elwain TJ ,Jameson B, Wiltshaw E, Spiers ASD, Gaya H: Oral non-absorbed antibiotics prevent infections in acute non-lymphoblastic leukemia. *Lancet* 837, 1977.
107. Thadepalli H, Gorbach SL, Broido PW, Norsen J, Nyhus L: Abdominal trauma, anaerobes and antibiotics. *Surg Gynec Obst* 137: 270, 1973.
108. Tillelli JA, Turek D, Jaffe AC: Sexual abuse of children: Clinical findings and implications for management. *N Engl J Med* 302: 319, 1980.
109. Truesdale R, D'Alescenan RD, Manuel V, Daicoff G, Kluge RM: Comparación de la profilaxis con antimicrobianos y placebos en la cirugía torácica no cardíaca. *JAMA* (en Argentina) 241: 1254, 1979 .
110. Van Scoy R: Prophylactic use of antimicrobial agents. *Mayo Clin Proc* 52: 701, 1977.
111. Washington II JA, Dearing WH, Judd ES: Effect of preoperative antibiotic regimen on development of infection after intestinal surgery: prospective, randomized double-blind study. *Ann Surg* 180: 567, 1974.
112. Wilkins TJ, Bennett JE: The selective use of systemic antibiotics in the treatment of burns. *Surg Gynec Obst* 151: 404, 1980.
113. Willis AT, Ferguson IR, Jones PH: Metronidazole in the prevention and treatment of bacteroides infections after appendicectomy. *Br Med J* 1: 318, 1976.
114. Willis AT, Ferguson IR, Jones PH: Metronidazole in the prevention and treatment of bacteroides infections in elective colonic surgery. *Br Med J* 1: 607, 1977.
115. Yates J, Holland J: A controlled study of isolation and endogenous microbial suppression in acute myelocitic leukemia patients. *Cancer* 32: 1490, 1973.
116. Yow MD, Mason ED, Leeds LJ, Thompson DJ, Klark DJ, Gardner SE: La ampicilina previene la transmisión intraparto del estreptococo grupo B. *JAMA* (en Argentina) 241: 251, 1979.

— — — —

Sólo el tiempo puede revelarnos al hombre justo; al perverso se le puede conocer en sólo un día.

Sófocles, 495 - 406 a. JC
Edipo Rey

MEDICINA
FUNDADA EN 1939
PUBLICACION BIMESTRAL
(Registro de Propiedad Intelectual Nº 1.051.984)
MEDICINA no tiene propósitos comerciales. El objeto de su creación ha sido propender al adelanto de la medicina argentina. Los beneficios que pudieran obtenerse serán aplicados exclusivamente a este fin

Publicada con el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

EDITORIALES

Cuáles arritmias cardíacas no deben tratarse

El tratamiento de las arritmias cardíacas suele ocupar un importante número de páginas en tratados y textos de cardiología, así como en los casi incontables libros dedicados en forma exclusiva al tema. Además, un porcentaje considerable de los trabajos de investigación publicados en las revistas médicas más difundidas se ocupan del mismo tema. Ello, quizá, sea responsable en buena parte de la tendencia del médico, clínico o cardiólogo, a efectuar el tratamiento específico cada vez que detecta un trastorno del ritmo cardíaco. A veces, incluso, la arritmia fásica respiratoria de niños mayores y adolescentes (la de antiguo llamada "arritmia de la salud") es mal interpretada y tratada en consecuencia. En contraste, es difícil encontrar en tales libros y revistas un capítulo o artículo dedicado por entero a puntualizar cuáles son las arritmias que no requieren medicación. Este hecho tiene particular interés por múltiples razones, pero las principales son: 1º frecuente prescripción de un plan terapéutico innecesario y, por lo común, de alto costo; 2º administración de drogas que en su mayoría presentan: *a*) efectos secundarios indeseables independientes de la dosis; *b*) escaso margen entre el nivel de los tenores plasmáticos útiles y los tóxicos, y *c*) capacidad de provocar arritmias tanto o más graves que las que se pretende combatir, aun en corazones sanos; 3º desencadenamiento de cuadros iatrogénicos en pacientes asintomáticos. Debido a la introducción de numerosas drogas antiarrítmicas en la última década (Zipes y Troup, *Am J Cardiol* 41: 1005, 1978; Wellens y col., *Am J Cardiol* 45: 130, 1980) los tres puntos del segundo factor han adquirido especial trascendencia. Algunas de esas drogas, en apariencia de escasa toxicidad y buena tolerancia, como la prenilamina (no rara vez empleada sin un diagnóstico certero o por una extrasistolia en corazón sano), son capaces de provocar arritmias mortales en dosis no muy elevadas (Engler y Le Winter, *Am Heart J* 101: 494, 1981; Grenadier y col., *Brit Heart J* 44: 330, 1980). Otras, utilizadas en gran escala en los últimos años, como la amiodarona, han sido responsabilizadas del desencadenamiento de afecciones extracardíacas graves, sin relación estrecha con las dosis administradas (Bekaert y col., *Coeur Méd Int* 18: 241, 1979; Marcus y col., *Am Heart J* 101: 480, 1981). También drogas introducidas en la terapéutica hace más de dos siglos, como la digital y quinidina, pueden causar una morbilidad y mortalidad considerables (Mason y Awan, *Am J Cardiol* 43: 1056, 1979; Selzer y Wray, *Circulation* 30: 17, 1964). El riesgo de ocasionar tales efectos está justificado y ampliamente compensado por los beneficios obtenidos, en arritmias que comprometen la vida (o la calidad de vida) de los individuos, pero resulta excesivo y aun prohibitivo para trastornos del ritmo cardíaco de escaso o nulo significado pronóstico.

Lo que antecede es el principal motivo de la reseña efectuada, en las líneas que siguen, sobre las arritmias que no requieren tratamiento (salvo circunstancias especiales).

1. *Bradicardia sinusal:* Cuando la frecuencia cardíaca, oscila entre 40 y 60 por minuto y no causa síntomas. Requiere controles periódicos que incluyen ECG dinámico (Holter de 24 h) si se trata de individuos mayores de 50 años. Tampoco se trata la que suele aparecer en el curso de un infarto agudo de miocardio si no ocasiona repercusión hemodinámica, no genera ritmos ectópicos (extrasistolia ventricular, ritmo idioventricular acelerado) y la frecuencia cardíaca es mayor de 45 por minuto.

2. *Arritmia sinusal:* Sea fásica o no fásica en individuos asintomáticos.

3. *Marcapaso variable ("wandering" pacemaker):* Sea dentro del nódulo sinusal, o de éste a la unión A-V.

4. *Ritmo de la unión A-V:* Cuando no obedece a causa demostrable, es asintomático y la frecuencia cardíaca es mayor de 45 por minuto. Tampoco se lo trata si cursa en sujetos vagotónicos o después de cirugía auricular (auriculotomía simple, suturas de tabique, operación de Mustard o de Blalock-Hanlon) si la frecuencia cardíaca es estable y mayor de 40 por minuto.

5. *Extrasistolia o parasistolia auricular:* Cuando es aislada, asintomática y sin causa aparente. Si existen factores causales, se tratan éstos (hipoxia, hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca, etc.). Si es muy frecuente, u origina molestias y angustia, se indica el tratamiento habitual.

6. *Taquicardia sinusal:* Sólo se trata la causa. En algunos casos de simpaticotonía o hipertiroidismo intensos (frecuencia cardíaca siempre mayor de 120 por minuto) se indica el tratamiento corriente (betabloqueantes).

7. *Taquicardia paroxística supraventricular:* No se las trata si son esporádicas (menos de un acceso anual) o breves (segundos o pocos minutos), salvo cardiopatía de base grave (ej.: infarto de miocardio agudo o reciente) o por temperamento ansioso del paciente.

8. *Aleteo y fibrilación auricular:* Asintomáticos, con frecuencia cardíaca en reposo menor de 90 por minuto y menor de 120 durante ejercicios comunes. Se trata la cardiopatía de base. Si se trata de formas paroxísticas se procede como lo señalado en 7.

9. *Extrasistolia o parasistolia ventricular:* No se tratan si no existe cardiopatía demostrable y pertenecen a los grupos 1 y 2 de Lown (Lown, *Am J Cardiol* 43: 313, 1979). A lo sumo, se suprimen o reducen sustancias excitantes (café, mate, cigarrillo, alcohol, catecolaminas). Se tratan las que cursan en cardiopatías (en especial la coronaria aguda y crónica) o si pertenecen a los grupos III, IV y V de Lown (Lown, *Am J Cardiol* 43: 313, 1979). No existe acuerdo si deben tratarse las que, perteneciendo a estos grupos, no se acompañan de cardiopatía de base y se originan en la pared anterior (¿músculo papilar?) del ventrículo derecho (Schamroth, *Prog Cardiovasc Dis* 23: 13, 1980).

10. *Ritmo idioventricular acelerado* (taquicardia ventricular "lenta"): Sólo se trata si su frecuencia es mayor de 110-115 por minuto.

11. *Taquicardia ventricular aislada o recurrente:* Aunque existen algunas excepciones (Dubner y col., *Rev Arg Cardiol* 49: 179, 1981), no parece ser necesario el tratamiento medicamentoso en la forma ambulatoria con corazón sano (tipo enfermedad de Gallavardin) si las crisis son breves (3 a 10 latidos), sobre todo en las originadas en el ventrículo derecho.

12. *Bloqueo sinoatrial:* No se trata en pacientes jóvenes y asintomáticos el de segundo grado tipo Mobitz I o tipo Mobitz II 3: 2 o menor. En mayores de 45 años suele ser expresión de cardiopatía orgánica (enfermedad sinusal), en especial los de mayor grado, y casi siempre requieren tratamiento.

13. *Bloqueo A-V de segundo grado tipo Mobitz I:* En sujetos jóvenes asintomáticos (por lo general vagotónicos como en 12) y de aparición episódica o esporádica (por ej.: durante el sueño), no requiere tratamiento. En el resto se trata la cardiopatía de base o el factor causal.

14. *Bloqueo A-V de segundo grado tipo Mobitz II con QRS angosto:* Suele ser expresión de un bloqueo intrahisiano. Deben efectuarse controles con ECG dinámico (Holter de 24 h) y casi siempre estudios electrofisiológicos. Casi todos requieren tratamiento.

15. *Bloqueo A-V completo con QRS angosto:* En pacientes jóvenes o en niños suele ser de origen congénito (intranodal en su mayoría), rara vez origina síntomas, es estable y no requiere tratamiento. La misma conducta puede asumirse en adultos de edad media y avanzada asintomáticos, aunque son necesarios controles periódicos estrictos para demostrar la estabilidad del ritmo de escape.

Tal como se desprende de esta lista, la casi totalidad de las arritmias cardíacas pueden no necesitar tratamiento en determinadas circunstancias.

Luis D. Suárez
Hospital de Clínicas José de San Martín,
Buenos Aires

Valor práctico de la onda R en el electrocardiograma de esfuerzo

La principal área de interés del electrocardiograma de esfuerzo, en lo que se refiere al diagnóstico y la evaluación de la cardiopatía coronaria, está focalizada en las modificaciones del segmento ST. Sin embargo, recientemente han surgido evidencias acerca del valor que tendría el estudio de los cambios del voltaje de la onda R luego del ejercicio.

La respuesta normal a una prueba de esfuerzo máxima es una reducción del voltaje de la onda R en las derivaciones precordiales izquierdas, acompañada de una profundización de la negatividad de la onda S. Bonoris y col (*Am J Cardiol* 41: 846, 1978) demostraron que en alrededor del 60 % de los pacientes coronarios se incrementa la amplitud de la onda R luego del esfuerzo en lugar de disminuir. Correlacionando estos hallazgos con la cinecoronariografía y la ventrículografía estos autores encontraron que los pacientes coronarios que presentaban estas respuestas anormales de la onda R eran los que tenían lesiones coronarias más extensas y ventrículos funcionalmente más deteriorados. El mismo grupo (Bonoris y col, *Circulation* 57: 904, 1978) comprobó en un grupo de pacientes coronarios que incluyendo el análisis de los cambios de la amplitud de la onda R en la interpretación clínica de las pruebas de esfuerzo, era posible incrementar significativamente la sensibilidad y la especificidad de la misma, para la detección y evaluación de la cardiopatía coronaria. Estos resultados fueron reproducidos en nuestro medio por Aptecar y col (*Rev Arg Cardiol* 47: 33, 1979). El análisis de la onda R en otras derivaciones diferentes de las precordiales izquierdas, de la onda S o de la amplitud total del complejo QRS no brindó correlaciones satisfactorias (Ellestad, comunicación personal). El criterio del voltaje de la onda R demostró ser útil para el diagnóstico de enfermedad coronaria aún en pacientes con bloqueo de rama izquierda (Uhl y col, *Am J Cardiol* 44: 1247, 1979), y en poblaciones con bajo riesgo coronario y alteraciones del segmento ST-T en reposo y en esfuerzo (Yiannikas y col, *Am J Cardiol* 47: 238, 1981).

Se ha postulado que uno de los probables mecanismos que determinan el comportamiento de la onda R luego del esfuerzo estaría relacionado con

la función ventricular izquierda y los volúmenes ventriculares. Brody (*Circ Res* 3: 731, 1956) observó una relación directa entre el volumen ventricular y la amplitud de la onda R. En base a este concepto podría aceptarse que la reducción de la onda R que se produce en la población normal y en los pacientes coronarios con enfermedad leve a moderada, se debe a la mejoría de la función ventricular y disminución de los volúmenes cardíacos como consecuencia del aumento de la contractilidad determinada por el elevado nivel de catecolaminas y del tono simpático que existe durante el ejercicio intenso. Por el contrario, en presencia de enfermedad coronaria avanzada con extensas áreas de isquemia y/o necrosis, la sobrecarga hemodinámica provocada por el esfuerzo deteriora la función ventricular a pesar de la hipertonía simpática. Esto provocaría un aumento de los volúmenes ventriculares y, de acuerdo al efecto Brody, elevaría el voltaje de la onda R. En nuestro laboratorio investigamos este aspecto a través del estudio del efecto de los nitritos sobre el voltaje de la onda R post-esfuerzo, teniendo en cuenta el hecho de la reducción de los volúmenes ventriculares provocada por dichas drogas. Observamos que en un grupo de pacientes coronarios en los que inicialmente la onda R aumentaba 1.1 $\pm$ 0.6 mm luego del ejercicio, se reducía 1.2 $\pm$ 0.5 mm ($p < 0.01$) si se administraba ungüento de nitroglicerina previamente (Mele y col, *Rev Arg Cardiol* 48: 85, 1980). En otro estudio (Lerman y col, *Chest*, en prensa) comprobamos que en los pacientes con infarto crónico asintomático la onda R disminuía de amplitud, con o sin nitritos previos, mientras que en los anginosos, con o sin infarto previo, aumentaba en la prueba de esfuerzo control y disminuía luego de la administración de nitritos. Estos hallazgos sugieren que existiría una relación entre los cambios del voltaje de la onda R post-esfuerzo y las modificaciones de la función y de los volúmenes que provocan los nitritos en los ventrículos isquémicos.

En contraposición con esta hipótesis, Battler y col (*Circulation* 60: 1004, 1979), no hallaron una correlación entre los cambios de la onda R y los volúmenes de fin de diástole, de fin de sístole y la fracción de eyección medidos con radioisótopos en reposo y luego de un esfuerzo en decúbito dorsal en un grupo de pacientes coronarios y otro de sujetos sanos. Paralelamente, Wagner y col (*Am J Cardiol* 44: 1241, 1979) encontraron que los individuos normales disminuían la amplitud de la onda R, mientras que los pacientes coronarios la incrementaban, pero no encontraron una correlación entre estos hallazgos y la gravedad de la enfermedad coronaria o el grado de deterioro ventricular, evaluados angiográficamente. En consecuencia, parece que el efecto Brody no es suficiente para explicar el comportamiento de la onda R luego del esfuerzo. Otros mecanismos que podrían intervenir en la génesis de estos hechos podrían ser modificaciones posicionales del corazón asociadas al descenso del diafragma que acompaña a la hiperventilación propia del ejercicio, cambios en la orientación de los vectores cardíacos y aumento en la impedancia torácica secundarios al mayor volumen de aire que hay en los pulmones durante el esfuerzo intenso. Estas son todas hipótesis teóricas no confirmadas, que por otra parte no explican las diferencias que se observan en el comportamiento de la onda R en individuos sanos y en pacientes coronarios. Wohltius y col (*Circulation* 60: 1028, 1979) demostraron que la amplitud de la onda R en sujetos normales aumenta en las primeras etapas del ejercicio, hasta alcanzar una frecuencia cardíaca de 140 latidos por minuto y luego cae dramáticamente hasta alcanzar el máximo esfuerzo y el período inmediato post-esfuerzo. Estos autores postulan que el motivo por el cual en los pacientes coronarios se observa incremento del voltaje de la onda R luego del esfuerzo, es que estos individuos en general realizan menor cantidad de esfuerzo y alcanzan una frecuencia cardíaca máxima menor que la población normal. En consecuencia,

no serían capaces de llegar a los niveles de frecuencia cardíaca en que normalmente se aprecia la reducción de la onda R, y sólo llegarían a una frecuencia cardíaca en la que habitualmente se observa aumento de la misma. En contraposición a esta hipótesis, en nuestro laboratorio hemos encontrado ejemplos de pacientes coronarios que, a pesar de alcanzar cifras de frecuencia cardíaca de 140 latidos por minuto o más, aumentaban el voltaje de la onda R luego del esfuerzo.

La controversia existente en lo que se refiere al significado de los cambios del voltaje de la onda R luego del esfuerzo podría explicarse por diferencias en la población de pacientes estudiados, posición en que se realizó el ejercicio, número y tipo de derivaciones empleadas y clase de esfuerzo realizado.

Pensamos que, aunque los mecanismos hemodinámicos y electrofisiológicos que inducen las variaciones del voltaje de la onda R luego del esfuerzo en pacientes coronarios no están bien dilucidados, hay suficientes evidencias clínicas como para justificar la inclusión de este criterio en el análisis y la interpretación clínica de las pruebas de esfuerzo. La mayor utilidad práctica de este criterio estaría radicada en los casos en los que el segmento ST es poco confiable. Esta situación se da en pacientes con bloqueo de rama izquierda, con tratamiento digitálico o diurético, con bajo riesgo coronario (sexo femenino, edad menor de 40 años, ausencia de factores de riesgo) o cualquier caso de desnivel del segmento ST sin angor concomitante. Por el contrario, también puede ser útil estudiar la onda R en los casos en los que se presenta angor típico en la prueba de esfuerzo sin cambios específicos del segmento ST, como se ve en algunos pacientes con infarto previo. Mientras tanto deben planearse nuevos estudios dirigidos a esclarecer la fisiopatología de los cambios de amplitud de la onda R correlacionando el electrocardiograma con la vectocardiografía para analizar los fenómenos vectoriales y la hemodinamia, la angiocardiografía y los estudios radioisotópicos para estudiar los volúmenes y la función ventricular, en reposo y en esfuerzo.

Jorge Lerman

Hospital de Clínicas José de San Martín,
Buenos Aires

Aspectos inmunológicos de la esclerosis sistémica progresiva

La esclerosis sistémica progresiva (ESP) es una enfermedad crónica, de causa desconocida, curso imprevisible y a veces severo compromiso sistémico. El espectro clínico va de la llamada forma difusa, con mayor compromiso sistémico, casi siempre con afectación cutánea proximal de miembros y tronco a la forma llamada CREST (calcinosis, Raynaud, motilidad esofágica anormal y telangiectasia), con menor compromiso sistémico y afectación cutánea limitada a la cara y dedos de manos y/o pies. (Le Rty EC. *Textbook of Rheumatology*, 1980; Rodnan GP. *Arthritis and Allied Conditions*, 1979). Durante muchos años la variante CREST ha sido considerada más benigna. Si bien su curso es habitualmente más prolongado y compromete menos rápidamente las vísceras, se sabe hoy que son éstos los pacientes que tienen mayor tendencia a desarrollar complicaciones como la hipertensión pulmonar, muchas veces terminal. Entre estos extremos se encuentra una gama intermedia cuya clasificación resulta a veces difícil. El diagnóstico de ESP se basa en hallazgos clínicos que habitualmente aparecen tardíamente en el curso de la enfermedad (*Arth Rheum* 23: 581, 1980). El hallazgo de "marcadores" serológicos que sir-

vieran para ayudar en el diagnóstico precoz o identificar subgrupos clínicos con diferente pronóstico sería, en consecuencia, de gran utilidad. Hasta hace algunos años se consideraba a la ESP como una enfermedad fibrosante con poca evidencia de fenómenos de autoinmunidad en su curso. En los últimos tiempos, el uso de técnicas más sensibles para la detección de autoanticuerpos ha permitido cambiar este enfoque. Sustratos consistentes de una capa de células, habitualmente de estirpe neoplásica, han incrementado la sensibilidad de la inmunofluorescencia indirecta (IMF) para la detección de anticuerpos antinucleares (ANA). Las razones son fundamentalmente dos: *a*) el hecho de ser una capa única de células facilita la visualización de los núcleos y evita el error que puede surgir al interpretar imágenes superpuestas, y *b*) los núcleos son más grandes y al ser de división rápida, el material expuesto es cuali y cuantitativamente diferente al de los cortes de tejido usados habitualmente. De esta manera se ofrecen antígenos no expuestos en tejidos en reposo (ej. centrómero). Utilizando este tipo de sustratos, la frecuencia de ANA en pacientes con ESP ha crecido de un 40-60 % (*Arth Rheum* 11: 607, 1968) a cifras que superan el 90 % (*Am J Med* 69: 520, 1980; *Arth Rheum* 23: 617, 1980). El tipo de imagen fluorescente visualizada es variable pero en general "moteada". El moteado, a su vez, presenta varios tipos. Uno de ellos, el así llamado moteado discreto, ha sido descripto en relación a células en metafase y parece corresponder a la tinción de los centrómeros cromosómicos (*Proc Natl Acad Sci* 77: 1627, 1980). La presencia de anticuerpos anticentroméricos estaría relacionada con la variante CREST de la ESP. La frecuencia del hallazgo, sin embargo, varía entre los diferentes trabajos. En la misma época y utilizando técnicas de inmunodifusión, se han detectado anticuerpos precipitantes dirigidos a una proteína nuclear soluble denominada Scl-70 (*J Biol Chem* 224: 10 514, 1979) en una frecuencia que oscila alrededor del 20 % de los pacientes con ESP. En nuestra experiencia, el hallazgo de anticuerpos precipitantes es frecuente aunque son heterogéneos y hasta ahora el único identificado como relativamente específico para la ESP es el mencionado.

Hasta el momento parece claro que: 1) Los pacientes con ESP presentan ANA en más del 90 % de los casos. 2) Habría hasta ahora dos marcadores séricos relativamente característicos de la ESP y aparentemente excluyentes entre sí: *a*) anticuerpos anti-centrómeros, detectados por IMF y relacionados con la variante CREST, y *b*) anticuerpos precipitantes contra la proteína nuclear soluble Scl-70. En nuestra experiencia, la combinación de IMF e inmunodifusión permitió detectar estos marcadores en 45 % de los pacientes. 3) La relación entre el hallazgo de estos autoanticuerpos y la causa de la enfermedad, si existe, se desconoce hasta la fecha. La proteína Scl-70 parece estar en relación con los ácidos nucleares. Si bien el antígeno centromérico no ha sido aislado aún, parece ser una proteína íntimamente ligada al ADN cromosómico. 4) El hallazgo de anticuerpos anti-centrómero en pacientes que luego han desarrollado la variante CREST cuando sólo presentaban un síndrome de Raynaud años antes, podría otorgar a este marcador considerable valor pronóstico (*Am J Med* 69: 520, 1980).

Ciertos aspectos de esta enfermedad están algo más claros. La frecuencia y heterogeneidad de autoanticuerpos ha quedado fuera de cuestión. Queda por ver qué relación existe entre estos hallazgos y la patogenia de la enfermedad, si realmente tienen valor pronóstico o si sirven para identificar subgrupos clínicos. El estudio de mayor número de pacientes podrá echar nueva luz sobre estos interrogantes.

Luis J. Catoggio

Royal National Hospital for Rheumatic Diseases. Bath, England

La batalla de Valmy y la medicina

El editorial del Dr. A. Lanari "La batalla de Valmy y la medicina" (*Medicina (Bs Aires)* 41: 257, 1981) comprende esquemáticamente tres partes: el relato de la batalla, el comentario y descalificación de la serie de leyendas que se tejieron para explicar el resultado, y la explicación médica que con el mismo fin dio Rudolf Marx. Al margen del ameno material informativo que brinda, creo que el principal interés del editorial no está en la explicación de Marx sino en que induce a pensar inquisitivamente en lo que pasó en Valmy. Al hacerlo, uno encuentra que lo único que está razonablemente claro es cómo ocurrió, es decir los hechos físicos que pasaron en el campo de batalla; pero al querer saber el por qué ocurrió así, uno se diluye en apreciaciones anecdóticas con un enfoque muy personal o estrecho, o en oscuros razonamientos más interesados en justificaciones que en aclarar los hechos. Y esto, naturalmente, estimula a tratar de dilucidar qué ocurrió realmente en Valmy.

El hecho concreto fue que en el campo de batalla de Valmy se enfrentaron dos ejércitos y perdió el que en los papeles, y según los sanos principios militares en boga, tendría que haber ganado.

Si las cosas hubieran ocurrido al revés, lo más probable es que Valmy hubiera entrado en la historia sin pena ni gloria, pero ese resultado irrespetuoso y poco gentil para con el buen hacer en las artes de la guerra, para con "la crema de los ejércitos de la época", y para con dos sobrinos de Federico el Grande; para mayor afrenta uno de ellos, el rey de Prusia, fue el principal culpable de la confusión que rodea a Valmy, ya que, en consecuencia, la historiografía prusiana se dedicó a justificar la derrota en vez de explicarla. Agravando las cosas, en el lado de enfrente, la Convención Nacional apreció rápidamente el valor publicitario de la victoria encontrada y la usó decididamente para promocionar su producto revolucionario.

A casi doscientos años y alejado geográfica y emocionalmente de la batalla, al estudiar las circunstancias que rodean a Valmy uno encuentra que nada fue exactamente como se sostenía contemporáneamente. Ni el ejército francés era tan débil, ni el ejército austro-prusiano era tan fuerte, ni el comando de éste tan bueno ni el de aquél tan malo. Tampoco las nuevas ideas, el patriotismo, o la "buena causa" de los soldados ciudadanos decidió el resultado, como lo comenta el editorial; al fin y al cabo en cada batalla se enfrentan dos buenas y dos malas causas, que se alternan según desde el lado que uno mira. Más aún, viendo tanto la dificultad que por formación y por las circunstancias tenía Brunswick para ganar una batalla decisiva, como su plan de campaña limitado a batir a los franceses para asegurarse las fortalezas de la frontera e invernar, uno llega a la convicción de que aunque la victoria hubiera sido de los aliados, el curso de la historia no hubiera cambiado.

Cuando uno considera lo antedicho, la famosa carga inconclusa de la infantería prusiana pierde gran parte de su importancia. Si a esto se le agrega que su valor se basaba en el concepto erróneo de dar por seguro que si se hubiera llevado a cabo hubiese decidido la batalla, cosa que la imaginación del bando perdedor parece haber aceptado como una especie de premio consuelo, pero que nunca vamos a saber si hubiera sido cierto porque la carga fue detenida, uno piensa que cualquiera haya sido el papel que las *Shighellae* jugaron en Valmy, y la interpretación de Marx también se presta a discusión, el papel que jugaron en la historia fue mucho más secundario de lo que quiso Rudolf Marx.

Sin querer restar importancia a la batalla de Valmy, creo que lo que no le cuadra es la idea de que su resultado podía impedir el advenimiento de una nueva época; idea originada en los emigrados franceses, a la que adhirieron Federico Guillermo II y su entorno, y también Goethe. Las proféticas palabras de éste en la noche de Valmy: "en este lugar y en el día de hoy se abre una época en la historia del mundo", resultaron mucho más ciertas al día siguiente y a unos 200 km al oeste de allí, cuando la Convención Nacional proclamó la República Francesa. Valmy fue un evento más en una cadena de hechos que condujo a una mutación histórica, a la que la infantería prusiana, con o sin *Shighellae*, era incapaz de detener.

Aparte de todo lo expuesto, aún me queda una duda: ¿Fueron realmente las *Shighellae* las que impidieron la carga de la infantería prusiana? Pero eso ya es otra historia.

A. Boffi

Instituto de Investigaciones Médicas,
Buenos Aires

Ciencia y fe

Con relación al mensaje que el Papa Juan Pablo II dirigiera a los profesores y estudiantes universitarios en la catedral de Colonia con motivo de su reciente viaje a Alemania [1].

Las relaciones entre la ciencia y la fe han cobrado especial auge en los últimos siglos, especialmente desde el fin de la edad media y comienzo del renacimiento, por el extraordinario desarrollo que ha tenido la ciencia desde entonces. Sin embargo, las interrelaciones de las religiones con las filosofías de la razón son tan viejas como el hombre y, por lo tanto, han estado en permanente revisión y cambio a través del curso de la historia.

La ciencia ha ido desentrañando fenómenos totalmente inexplicables tiempo atrás y, sin proponérselo quizás, ha ido desplazando a la religión y a la Iglesia en forma progresiva en múltiples áreas. Por ejemplo, el médico o el psiquiatra han

reemplazado en gran parte al sacerdote como consultor ante problemas y conflictos psicológicos y de la conducta. Igualmente la religión ha retrocedido en múltiples otras áreas y disciplinas en las cuales antes era consultada. La consecuencia de este poderoso avance de la ciencia ha sido la formación de una conciencia científica cada vez mayor. Esta conciencia científica se ha convertido a su vez en una religión, en la cual la fe ya no está dirigida a un ser superior sino directamente a la ciencia y los hombres. Por lo tanto, el hombre ha ido creyendo más y más en el hombre, construyendo una sociedad secularizada, es decir prescindente de la verdad revelada. Súbitamente, entonces, a esta nueva sociedad cientificista se le comienza a exigir más de lo que puede brindar y simultáneamente se le ponen términos para resolver los grandes problemas que aquejan a la humanidad. La ciencia responde a este desafío como puede, logra éxitos increíbles, mejora la vida en su calidad y duración pero, obviamente, no puede satisfacer todos los requerimientos. Es más, para conseguir resultados utilitarios y precoces la ciencia muchas veces no respeta al hombre como tal, lo utiliza, lo manipula o sojuzga, o hace uso y abuso de la naturaleza destruyendo su ecología, etc. Estos y otros inconvenientes han provocado una crisis de confianza en la ciencia, y el vacío ha sido llenado por nuevas ideologías y religiones que aprovechan las limitaciones propias del conocimiento científico. Recientemente, se han visto aparecer sentimientos anticientíficos o de indiferencia y total falta de asombro ante las promesas y descubrimientos científicos. A este momento crucial del desarrollo de la ciencia y la investigación el actual Papa Juan Pablo II lo ha definido como crisis de legitimación de la ciencia. Con motivo de su reciente viaje a Alemania y el encuentro que mantuvo con profesores y estudiantes universitarios en la catedral de Colonia [1], tuvo oportunidad de expresar sus ideas o las de la Iglesia sobre este tema tan actual e importante. En esa oportunidad, fundamentalmente, asumió la tarea de defender el verdadero quehacer científico y la ciencia en este momento de crisis y delimitó su relación con la fe.

Limitaciones de la ciencia

Resulta de fundamental importancia entonces definir cuáles son las limitaciones de la ciencia para no tener estos conflictos arriba mencionados. El mismo Papa, en otra oportunidad, ha dicho "... La verdad es que el desarrollo tecnológico característico de nuestro tiempo, padece de una ambivalencia de fondo: mientras por una parte consiente al hombre tomar las riendas de su propio destino, por la otra lo expone a la tentación de sobrepasar los límites de un razonable dominio de la naturaleza, poniendo en peligro la misma sobrevivencia e integridad de la persona humana" [2], y también agrega: "La fe corrobora el derecho propio de la razón natural: lo presupone; porque al aceptarla presupone esa libertad que es propia exclusivamente del ser racional. Así demuestra que fe y ciencia pertenecen a dos órdenes distintos del pensamiento, los cuales no son mutuamente transferibles. Resulta, sin embargo, que la razón no lo puede todo por sí misma; es limitada..." [1].

En otra oportunidad supo decir: "No ésta (la fe) una demanda acuciante de los hombres de nuestro tiempo que buscan a veces desesperadamente, y como a tientas, el sentido de su vida, su sentido último". A pesar de las diferencias de origen y orientación las ideologías modernas tienen el punto de encuentro en la encrucijada de la autosuficiencia del hombre sin que ninguna consiga saciar la sed de absoluto que lo atenaza. Pues "el hombre sobrepasa infinitamente al hombre", como afirmaba Pascal en sus *Pensamientos*. Y por ello, de la excesiva plenitud de sus certezas y asimismo del vacío de sus interrogantes, resurge constantemente la búsqueda del Infinito, cuya imagen no puede cancelar ni siquiera cuando huye de ella: "Tú estabas dentro de mí y yo estaba fuera de mí mismo", confesaba ya San Agustín (*Confesiones*, X, 27)[5].

Karl Popper confiesa en sus diálogos con Eccles [3]: "... Sin embargo yo creo que debemos ser claros sobre nuestras limitaciones presentes, y que existen cosas que lucen actualmente como si fuesen misterios eternos...".

Frente a esas limitaciones Juan Pablo II recomienda una estrecha unión entre la ciencia y la Iglesia, porque de un diálogo abierto y libre entre ambas, y con la participación de la verdad revelada, se puede lograr un conocimiento más acabado de la verdad que el que se logra por la vía de la razón solamente. Es más, a los cristianos creyentes les recuerda que "... la ciencia alcanzada con la razón encuentra su plenitud en la contemplación de la verdad divina...". Es curioso cómo esta observación se reproduce con inusitada frecuencia en algún momento de la vida de los científicos con espíritu inquieto y libre. El famoso Sherrington, en 1952, sostenía en un emocionado discurso: "Para mí, ahora, la única realidad es el alma humana..." [4], definiéndose frente a las teorías de concepción materialista del hombre. Existen múltiples ejemplos de científicos famosos que públicamente han manifestado expresiones que hacen recordar "la plenitud de la contemplación divina" de que nos habla Juan Pablo.

Un humanismo para el tercer milenio

Como método para lograr este ensamble entre ciencia y fe recomienda "... especialmente dos virtudes: la virtud de la valentía capaz de proteger la ciencia en un mundo titubeante, alejado de la verdad y necesitado de sentido, y la virtud de la humildad con la que reconocemos la limitación de la razón ante una Verdad que desborda..." [1]. Recuerda, también, que la ciencia y la investigación deben estar antes que nada al servicio del hombre y de la cultura, en clara alusión a todas las ideologías que no han sabido respetar los derechos y la dignidad humana. Pero además agrega: "... sería demasiado poco limitarse a este aspecto..." ya que "... el conocimiento de la verdad lleva en sí mismo su propio sentido...", y prosigue: "... la pura teoría es una forma de 'praxis' humana y al creyente le espera una 'pra-

xis' suprema, una 'praxis' que le une para siempre a Dios: es la visión que es, pues, una teoría" [1].

Simultáneamente, agrega que la ciencia por ser un acto que tiende a la verdad y el bien humano debe ser libre, es decir libre por definición; pero la ciencia también debe "... ser libre en el sentido que su desarrollo no puede estar determinado por fines inmediatos, por ventajas sociales o por intereses económicos". Esto no significa que ella tenga que estar separada por principio de la praxis. "Pero para tender a la praxis tiene que estar previamente determinada por la verdad, tiene que ser por lo tanto libre para la verdad". En otro párrafo recomienda que la ciencia debe ser abierta y pluralista y no temer antes una pérdida de una orientación unitaria.

Este ha sido un comentario e insuficiente resumen de la extraordinaria alocución de SS Juan Pablo II ante los científicos de Alemania, en la cual tuvo oportunidad de explayarse sobre este interesante tema de ciencia y fe, y sentar las bases para iniciar el rescate de la ciencia frente a esta crisis de legitimación que actualmente soporta.

Hugo A. Palmero, Agustín Caeiro
Hospital Privado, Córdoba

1. Juan Pablo II: Ciencia y fe. Discurso a los profesores y estudiantes en la Catedral de Colonia. *L'Osservatore Romano*, 23 de noviembre, p 6, 1980.
2. Juan Pablo II: Valores humanos y normas éticas en el ejercicio de la medicina. *L'Osservatore Romano*, 5 de abril, p 13, 1981.
3. Popper K, Eccles JC: The self and its brain. Springer, p 563, 1977.
4. Eccles JC: Facing realty. Springer, p 174, 1970.
5. Juan Pablo II: El drama espiritual de nuestro tiempo. *L'Osservatore Romano*, 5 de abril, p 205, 1981.

Efecto del levamisol sobre la conversión tuberculínica en niños desnutridos

Respecto a la carta publicada en *Medicina (Bs Aires)* 41: 265, 1981, sería interesante señalar que:

a) Muchas de las lesiones inmunológicas humorales y celulares ocasionadas por malnutrición calórica-proteica pueden superarse cuando los pacientes son tratados con una adecuada dieta [1-3].

b) S. Olusi y col.[4], estudiando el efecto del levamisol sobre la respuesta inmune, en un modelo experimental en ratas, observaron que el mismo provocaba una marcada mejoría en la inmunidad celular, pero de menor magnitud que la ocasionada, durante el mismo tiempo de tratamiento, con una adecuada dieta proteica. También observaron el efecto sinérgico del levamisol sobre el suplemento dietético.

c) Respecto a la dieta utilizada en el tratamiento de los niños del estudio, suponemos que ésta no fue la adecuada por el tiempo excesivamente largo (4 meses) necesario para la recuperación; trabajos de nuestro grupo muestran que los niños desnutridos e infectados realimentados con una adecuada dieta calórica-proteica se recuperan en 3 semanas de alimentación *ad libitum*.

María E. Río de Gómez del Río y *Nora H. Slobodianik*
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

1. Geefhuysen J, Rusen EU, Katz J, Ipp T, Metz J: Impaired cellular immunity in Kwashiorkor with improvement after therapy. *Br Med J* 4: 527, 1971.
2. Edelman R, Suskind R, Olson RE, Sirisinha S: Mechanisms of defective cutaneous hypersensitivity in children with protein-calorie malnutrition. *Lancet* 1: 516, 1973.
3. Schlesinger L, Stekel A: Impaired cellular immunity in marasmic infants. *Am J Clin Nutr* 27: 615, 1974.
4. Olusi SO, Jessop WJE, Shoroye A: Effects of Levamisole on the immune responses of experimentally malnourished rats. *Pediat Res* 13: 1237, 1979.

COMENTARIOS BIBLIOGRAFICOS

Cefaleas. Diagnóstico y tratamiento. Robert E. Ryan, Robert E. Ryan (h). Editorial Bernardes, Buenos Aires, 1980, 491 pp.

Los doctores Robert E. Ryan y Robert E. Ryan (h), profesor de otorrinolaringología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Saint Louis, EE.UU., el primero, y directores ambos del Ryan Headache Center de la misma ciudad, son los autores de una interesante monografía sobre un tema de constante aplicación en la consulta médica general. Según los autores, es por demás frecuente la incidencia de automedicación en pacientes que acusan síntomas de cefaleas, que recurren a soluciones propuestas por personas sin capacitación médica que, a su vez, padecen el mismo mal. En cuanto a la legión de individuos que concurren a la consulta médica con síntomas severos, estos constituyen verdaderos problemas para el facultativo, dada la extensa serie de procedimientos destinados a establecer el origen y el mecanismo del dolor de cabeza, entre los que se incluyen métodos de indiscutible complejidad, como la tomografía computada, la visualización de las arterias por medio de sustancias de contraste, o la electroencefalografía.

Sobre la base de una excelente bibliografía, los autores describen las estructuras anatómicas fundamentales, así como el tema de la inervación cérvico-craneana y la distribución vascular de estas regiones del organismo. Especialistas en otorrinolaringología, tratan con acierto y autoridad el tema de las cefaleas provocadas por afecciones del oído, de la faringe, de la nariz y de los senos paranasales, mientras que otros colaboradores se ocupan de temas ultraespecializados. Entre éstos cabe mencionar el de la biorrealimentación relacionado con cefaleas, capítulo éste que consideramos no debió haberse incluido en una publicación como la que nos ocupa, por ser una teoría sustentada sobre bases médicas discutibles y no probadas. Las cefaleas vasculares son tratadas, con muy buen criterio, en uno de los capítulos más salientes y extensos del libro, y han sido analizadas en profundidad y con gran minuciosidad. En particular, la migraña o jaqueca es estudiada en su forma clínica común y en sus diferentes variantes, junto con sus aspectos farmacológico y terapéutico que resultan expuestos con claridad; con conceptos actualizados e instructivos sobre los más modernos ensayos con los nuevos recursos, tales como la metisergida, el pizoticeno, los betabloqueantes y la clonidina. También las "cefaleas de tensión" y aquellas originadas en procesos cervicales, en particular la espóndilo-artritis, han merecido un exhaustivo análisis, otorgándoseles toda la trascendencia debida a su alta frecuencia de aparición en clínica. Aunque no constituye un aporte a la tecnología médica, se puede considerar este trabajo como una excelente revisión del importante tema de las cefaleas, pues su enfoque múltiple sobre las distintas patogenias del dolor, amplía considerablemente el horizonte diagnóstico al clínico, al neurólogo y al otorrinolaringólogo.

Micología Médica. Ricardo C. Zapater. El Ateneo, Buenos Aires, 1981, 270 pp.

Esta obra traduce la experiencia de un conocido micólogo, autor del difundido "Atlas de Diagnóstico Micológico", quien en esta ocasión ha ampliado los temas, dando una mayor extensión al aspecto clínico. El resultado es un texto que será muy útil, tanto para el laboratorista como para el médico y el estudiante de medicina. La primera parte del volumen se refiere a generalidades de hongos patógenos, detallando causas de infección, características de estructura y modalidades de reproducción. Los capítulos 3 y 4 están dedicados a aspectos técnicos, precisando formas de obtención de muestras (según se trate de micosis superficiales, micosis profundas u hongos del aire) y de su procesamiento (examen directo, cultivo, inoculación experimental, determinación de caracteres fisiológicos). El capítulo "Sistemática" presenta una clasificación sencilla, en base a definiciones precisas, y a la vez suministra claves para la identificación directa en el tejido parasitado. El libro se extiende luego en la consideración de cada una de las entidades fúngicas, detallando aspectos históricos, fuentes de infección, características clínicas, pronóstico y tratamiento. Entre los diversos capítulos se destaca el dedicado a micosis oculares, tema que ha suscitado la preferente atención del autor en estos últimos años. En el apéndice se describen formas de preparación de medios de cultivo, tanto comunes como especiales. El texto está ilustrado en forma adecuada y didáctica por 155 fotografías y numerosos dibujos. La bibliografía (292 citas) se destaca por su actualización, sobre todo tratándose de un libro, ya que se extiende hasta referencias correspondientes al año 1980. En suma, la obra representa una valiosa contribución a los diversos aspectos que integran la micología médica.

Kuru: Early letters and field-notes from the collection of D. Carleton Gajdusek. Judith Farquhar, D. Carleton Gajdusek (eds), Raven Press, New York, 1981, 338 pp.

Kuru significa temblor o escalofrío en el idioma de la tribu *Fore*, que habita una zona de Nueva Guinea; es el nombre dado por estos aborígenes a una enfermedad caracterizada por temblor y ataxia cerebelosa progresiva, hasta llegar a la muerte en menos de un año después de los primeros síntomas. Fue descripta por primera vez por Gajdusek, quien en este volumen reune sus cartas y notas personales, casi en forma de diario, escritas durante el año 1957, en el cual observó 250 casos de Kuru entre 35 000 aborígenes. Es interesante seguir, a través de esta copiosa correspondencia, los primeros estudios epidemiológicos del Kuru, su delimitación dentro de una zona determinada, su prevalencia en niños y mujeres, su descripción neurológica, los detalles de las primeras autopsias realizadas en condiciones difíciles y sumamente precarias y, especialmente, el relato de las expediciones en plena jungla, penetrada por primera vez por un médico occidental. La impresión inicial sugería una etiología infecciosa, la que se dejó de lado por falta de pruebas tanto virales, bacteriológicas como parasitológicas, con falta de respuesta a una amplia gama de antibióticos; se sospechó, entonces, que se trataba de una enfermedad genética, heredofamiliar y/o asociada a una causa tóxica, que se buscó con análisis de metales como el cobre y el manganeso, incorporando luego un análisis de todas las yerbas exóticas, muchas de ellas desconocidas hasta el momento, con que se alimentaba esa tribu. Hacia el final de la expedición, Gajdusek estaba convencido que no se trataba de una enfermedad esencialmente genética, ya que no aparecía en la descendencia de los que salían de la zona para casarse con miembros de otras tribus vecinas; también descartaba la etiología tóxica, ya que algunos de los que salían de la zona desarrollaban la enfermedad y morían lejos de su casa; por todo eso, la etiología infecciosa seguía en pie pero faltaban las pruebas. Todo eso se vislumbra a través de la profusa correspondencia intercambiada, entre otros, con Sir Macfarlane Burnet —en cuyo Instituto, en Melbourne, Gajdusek acababa de permanecer un año estudiando anticuerpos asociados a enfermedades autoinmunes—, con Joseph Smadel, director asociado de los *National Institutes of Health* (NIH) de Bethesda; con John Eccles, profesor de neurofisiología de Canberra. El espíritu científico, la autocrítica, el empeño y el entusiasmo llevaron a Gajdusek y a Vin Zigas, un médico australiano, a superar todas las dificultades, que fueron muchas, para estudiar los casos de Kuru que acudían a su primitivo hospital, al ganarse la confianza de los aborígenes. Estas cualidades tan definidas fueron también las que limaron las diferencias surgidas de estudios realizados simultáneamente en Australia y en Estados Unidos, ya que Gajdusek enviaba material de autopsias, sueros, etc., en ambos direcciones. Durante ese año los dos médicos escribieron los 3 primeros trabajos que describen la enfermedad, los cuales aparecieron casi simultáneamente en 3 países diferentes: en el *New England Journal of Medicine* (267: 974, 1957), en el *Medical Journal of Australia* (2: 745, 1957) y en el *Klinische Wochenschrift* (36: 445, 1958).

Este volumen termina con la vuelta a Bethesda de Gajdusek. Si bien tiene un prefacio explicativo, hubiera ganado con un epílogo incluyendo la conferencia pronunciada por Gajdusek al recibir el Premio Nobel en 1976, casi 20 años después de su expedición en Nueva Guinea, por dilucidar la etiología del Kuru; los interesados la pueden encontrar en *Science* (197: 943, 1977). El Kuru tiene una etiología viral comprobada, lo mismo que la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob: se trata de un retrovirus de la subclase *Lentivirus E* (ver *Medicina (Bs Aires)* 40: 353, 1980), mejor conocido como virus lento del sistema nervioso. Esto lo demostró Gajdusek al inocular preparados acelulares de cerebro de enfermos a primates, los cuales desarrollaron la enfermedad después de una latencia de varios años. Retrospectivamente, se llegó a la conclusión que la "epidemia" de Kuru en aborígenes de una zona bien delimitada de Nueva Guinea, se debía al canibalismo, es decir, a la costumbre de esta tribu de "comerse a su familiar muerto", distribuyendo las partes más codiciadas, como el cerebro, a las niños y a las mujeres. Se supone que de un caso inicial de enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, se fueron consiguiendo de esta manera pasajes virales seriados en el hombre; la prueba definitiva es que desde que se civilizó esta tribu, con la desaparición del canibalismo, dejaron de presentarse casos de Kuru en niños, y fueron desapareciendo paulatinamente los casos en adultos. Gajdusek, en carácter de director del centro de estudios de las enfermedades del sistema nervioso en Bethesda, sigue estudiando la participación de los virus lentos en enfermedades como la esclerosis múltiple, la demencia senil, la enfermedad de Parkinson, etc. Es interesante hacer notar que estos virus lentos tienen transcriptasa inversa, por lo cual pertenecen a los retrovirus, cuyos prototipos son virus oncogénicos, lo cual abre una serie de especulaciones interesantes que no escapan a los virólogos. En definitiva, este libro tiene un interés especial para los que cultivan la historia de la medicina y el por qué de la investigación científica, por un lado y, más específicamente, para los que trabajan en virología y en neurología.

Fisiopatología clínica. Fernando Bevilaqua, Eddy Bensoussan, Joe Manoel Jansen Da Silva, Fernando Spinola E. Castro, Leo Pinto Carvalhaes. El Ateneo, Buenos Aires, 1980, 624 pp.

La traducción del portugués de "Fisiopatología Clínica" publicado por un grupo de médicos del Departamento de Medicina Interna de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Río de Janeiro, constituye un aporte de valor en la enseñanza del amplio tema tratado.

Entre los capítulos que merecen ser destacados incluiríamos los dedicados a la fisiopatología de los trastornos inmunológicos y genéticos, del metabolismo intermedio, del aparato cardiovascular, renal y respiratorio. Asimismo, el capítulo de alteraciones del sistema endocrino, revisa con detalle y profundidad la fisiopatología de la adenohipófisis, tiroides, paratiroides, suprarrenales, ovario y testículos con esquemas que son precisos, claros y didácticos.

En estos capítulos se describen los mecanismos de enfermedad cuyo conocimiento se ha incorporado a la medicina en los últimos veinte o treinta años modificando considerablemente el ángulo desde el cual se acerca el clínico o el especialista a las distintas entidades mórbidas. Ello hace que este libro sea altamente recomendable para el estudiante y para el graduado, que necesite una información bastante filtrada dentro de la profusión de publicaciones existentes sobre el complicado tema de la fisiopatología.

Malignant solid tumors in children: a review. Wataru W. Sutow. Raven Press, 1980, 236 pp. u$s 27,20.

La experiencia del autor, profesor del Hospital M. D. Anderson de Houston, Texas, en el estudio y tratamiento de los tumores sólidos en los niños y adolescentes le han permitido redactar con fundamento este volumen que reune una revisión histórica y actualizada del tema. El primer tema desarrollado es la incidencia de esta enfermedad en los niños, y transcribe prolijos estudios epidemiológicos que demuestran que la misma no sólo varía en distintas regiones geográficas, sino que aun en zonas diferentes de un mismo país. Posteriormente, se refiere a los factores etiológicos y genéticos de esta enfermedad, donde puntualiza la correlación de determinar malformaciones congénitas y su coincidencia con una neoplasia (ej.: hemihipertrofia corporal y nefroblastoma). Asimismo, puntualiza la coincidencia entre alteraciones cromosómicas y leucemia o retinoblastoma e inmunopatías y linfomas.

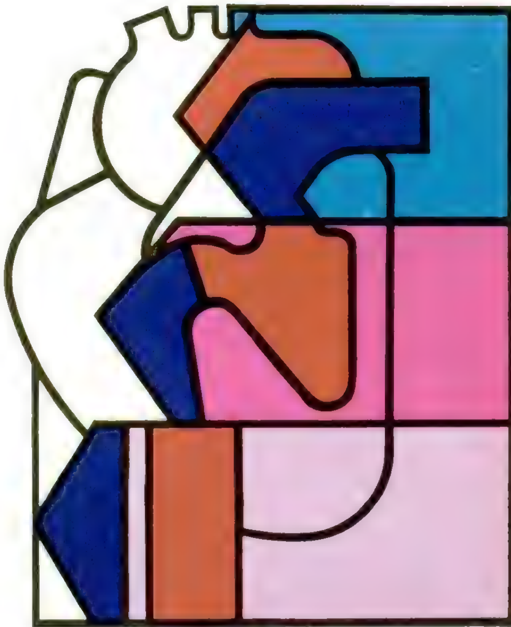
Su primer capítulo termina con definiciones precisas para el diagnóstico, clasificación por estadío, factores de riesgo y la metodología para la elaboración de protocolos de tratamiento y seguimiento. No olvida de mencionar las consideraciones ético legales. El segundo capítulo, es una síntesis de las distintas fases que experimenta el niño con cáncer y su familia. Desde el momento del primer síntoma, el examen físico, procedimientos diagnósticos, hasta la evaluación socio-económica y el impacto sicológico que provoca esta enfermedad. También se refiere a la determinación de la extensión de la enfermedad y la selección del tratamiento adecuado. El tercer capítulo, se refiere al aspecto terapéutico multidisciplinario, ya que esta disciplina no puede realizarse en forma unipersonal y requiere, forzosamente, la colaboración de todas las especialidades médicas y quirúrgicas durante toda la evolución de la enfermedad. En el capítulo cuarto, detalla las características de las drogas antitumorales empleadas actualmente en pediatría (vías de administración, dosis, toxicidad, efectividad y combinaciones en su uso clínico).

Los capítulos siguientes se refieren especialmente a neuroblastoma, tumor de Wilms, rabdomiosarcomas y tumores óseos. Sutow reconoce que los tumores sólidos como el nefroblastoma, rabdomiosarcomas de la órbita y urogenitales y los osteosarcomas, han recibido un beneficioso aporte en cuanto a su control con medidas terapéuticas que resultan efectivas. Quedan otros tumores sólidos en los cuales persisten las dificultades en lo concerniente a la terapéutica y resultados positivos (ej.: neuroblastomas, tumor de Ewing de localizaciones proximales). Completa esta revisión con un capítulo dedicado a los niños que viven libres de enfermedad. Considera los efectos tardíos de la terapia instituida (cirugía, quimio o radioterapia) y la posibilidad de recurrencia tardía del tumor y a la posibilidad de la aparición de un segundo tumor. También desarrolla el tema del niño que no curará, y es acá donde la complejidad en la atención de estos niños exige lo mejor del arte médico. El epílogo se refiere a la búsqueda de factores etiológicos, genéticos y pronósticos de esta enfermedad.

NIFELAT

Nifedipina 10 mg.

Bloqueante de los canales de calcio



Aumenta la oferta de oxígeno

Actúa sobre el músculo cardíaco

Vasodilata las arterias periféricas

- Aumenta la oferta de oxígeno en el miocardio por disminuir la resistencia de las arterias coronarias. Su efecto dilatador alcanza los vasos intra murales como también los grandes troncos coronarios.
- Actúa sobre el músculo cardíaco, produciendo una disminución del consumo de O_2. Su leve efecto inotrópico negativo, disminuye el consumo de ATP con el consiguiente ahorro energético.
- Vasodilata las arterias periféricas y constituye una medicación de elección para el tratamiento de las crisis hipertensivas, acompañadas de encefalopatía y/o insuficiencia ventricular izquierda.

p. v. p. al día 19/10/1981
Envase con 50 cápsulas $ 70.374.-

CUANDO LE SOLICITEN UNA PRUEBA ASO ASEGURE EL DIAGNOSTICO CON STREPTOZYME®

Mientras que los ensayos convencionales detectan solo ASO, STREPTOZYME detecta además de ASO otros anticuerpos* a exoenzimas indicadores de una infección a estreptococos.

STREPTOZYME permite detectar a más pacientes con anticuerpos a estreptococos, que efectuando las determinaciones con las pruebas ASO solamente. Vale el ejemplo de un estudio en el cual de 76 pacientes con infección estreptocócica confirmada, STREPTOZYME detectó el 95% mientras que con ASO solo el 60%. [(1)]

En presencia de un cuadro clínico compatible, una prueba STREPTOZYME, positiva, ayuda a confirmar el diagnóstico de fiebre reumática o glomerulonefritis aguda post-estreptocócicas. Debido a que STREPTOZYME detecta múltiples anticuerpos a exoenzimas incluyendo a ASO, *LOS TITULOS SE EXPRESAN EN UNIDADES STZ Y NO EN UNIDADES TODD.*

PARA BUSQUEDA

STREPTOZYME es ideal debido a que detecta a más pacientes en riesgo y a menudo anticipadamente en el curso de la enfermedad que utilizando solamente pruebas ASO. [(2)]

PARA CELERIDAD Y CONVENIENCIA

Mientras que las pruebas convencionales ASO se realizan en aproximadamente 2 horas, STREPTOZYME es una prueba en placa, simple en su realización, con facilidad en la visualización del punto final, en exactamente **2 minutos.**

PARA TITULACION

La simplicidad de la prueba STREPTOZYME facilita la tarea de titulaciones seriadas.

* AH, ASK, ADNasa, ANADasa. (anti: hialuronidasa, estreptoquinasa, desoxirribonucleasa, nicotinamida adenina dinucleotidasa).

Referencias:

(1) Bisno AL, Ofek I: Am. J. Dis. Child 127:681 - (Mayo) 1974.

(2) Bergner - Rabinowitz S, Fleiderman S, Ferne M. y col.: Clin. Pediatr. 14:804-809, (Sept.) 1975.

AVISO A LOS SUSCRIPTORES

Nos permitimos recordarle que el importe de la renovación de su suscripción en:

MEDICINA

BUENOS AIRES

VOLUMEN 42 - 1982

Suscripción Anual:	$	200.000
Médicos Residentes:		
Becarios:	$	140.000
Estudiantes:		
Cobrador a Domiciilo:	$	155.000 ó $ 220.000
Exterior:	u$s	35

NOMBRE ....

DIRECCION ....

Cheques o giros a la orden de: FUNDACION REVISTA MEDICINA

MEDICINA
Instituto de Investigaciones Médicas
Donato Alvarez 3150
1427 Capital Federal

SENTIMOS LA RESPONSABILIDAD ... QUE:

...oxicam

... óptima

... misma

... de tabletas

... permite

... nivel de

... nido con

... 20

... diaria

... RELACION

... TOLERANCIA

...Marc...

En trastor... 20 mg diarios.

En ga...

PRE... FELDENE 20 mg x 20 caps $ 186.835.-

MEDICINA (BUENOS AIRES)
FUNDADA EN 1939
ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA
REVISTA BIMESTRAL
(Registro de la Propiedad Intelectual Nº 87.075)
Publicada con el apoyo del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)
MEDICINA no tiene propósitos comerciales. El objeto de su creación ha sido propender al adelanto de la medicina argentina. Los beneficios que pudieran obtenerse serán aplicados exclusivamente a este fin
Aparece en Current Contents, Biological Abstracts, Index Medicus y Excerpta Médica

REGLAMENTO DE PUBLICACIONES

MEDICINA *publica trabajos de medicina clínica o experimental, entendiéndose este término en el más amplio sentido de la palabra. Los artículos a publicarse deberán ser originales e inéditos aunque serán también aceptados aquellos que hubieran sido comunicados en sociedades científicas o publicados en forma de «resúmenes». En caso de haber sido presentado a la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, corresponderá mencionarlo citando la fecha de la reunión.*

La redacción se reserva, además, el derecho de introducir —con el conocimiento de los autores— todos los cambios editoriales exigidos por las necesidades tipográficas, la compaginación, el reglamento de publicaciones o por razones económicas.

Casuísticas, Adelantos en Medicina, Artículos Especiales y *Cartas al Comité de Redacción* serán publicados en castellano. Los *Artículos Originales* podrán redactarse en castellano o en inglés indistintamente. Los manuscritos deberán ser escritos a máquina, a doble espacio, y enviados por duplicado.

Las *historias clínicas* serán expuestas sintéticamente. Protocolos, registros, etc., sólo se reproducirán si ilustran significativamente el texto.

Las *tablas*, presentadas en hojas individuales, deberán estar numeradas, ser indispensables y comprensibles por sí mismas, y poseer un título claramente explicativo de su contenido. Sólo se permitirá una superficie total de tablas equivalente a una página de la Revista: todo excedente estará a cargo del autor.

Las *figuras* comprendiendo ilustraciones de cualquier naturaleza (radiografías, fotografías, registros, etc.), se presentarán numeradas correlativamente. En su parte posterior llevarán una inscripción a lápiz que permita identificarlas. Cada figura tendrá una leyenda explicativa. Debe evitarse la superposición de tablas y figuras.

La *bibliografía*, presentada en hoja aparte, deberá limitarse a aquellos artículos directamente relacionados con el trabajo mismo, evitándose las revisiones bibliográficas extensas que sólo serán aceptables en la sección *Adelantos en Medicina*. Las referencias se presentarán numeradas, en orden alfabético de autores *con los títulos de las publicaciones.* Los nombres de la revista figurarán en forma abreviada según el Index Medicus (ej.: J. Clin. Pathol. 19: 391, 1960). Los libros deberán figurar con su título, editor, ciudad y año de aparición.

Resumen: El trabajo deberá presentar un resumen de unas 200 palabras. *Además, contendrá un resumen más explicativo (de hasta 700 palabras) en inglés, con su título completo y con referencias a las figuras y tablas.*

Con motivo del constante aumento de los costos de edición, la Revista se hará cargo solamente de la impresión de 4 páginas (incluyendo tablas y figuras) para cada artículo original. Los autores deberán abonar los gastos que demande la mayor extensión de sus trabajos. El Comité de Redacción se reserva el derecho de solventar totalmente aquellos artículos de investigación clínica que considere de especial interés.

Se ruega enviar dirección postal y número de teléfono particular para facilitar el envío de pruebas de galera.

Secretaría y Redacción (de 8.30 a 17 hs.): Ana G. de Delisio, Instituto de Investigaciones Médicas, Donato Alvarez 3150, 1427 Buenos Aires. T. E. 52-0061/64.

Suscripción	Argentina	$	200.000
	Con cobrador a domicilio	$	220.000
	Números sueltos	$	45.000
	Extranjero	u$s	35

Correo Argentino	Central "B"	Franqueo pagado Concesión Nº 856
		Tarifa reducida Concesión Nº 666

Publicidad: Dr. Horacio J. Delisio, T. E. 52-0061/64
Sra. Nélida B. de Pecoraro

Las suscripciones corresponden de enero a diciembre de cada año. Los pagos se podrán hacer personalmente o por correo con cheque o giros a la orden de Fundación Revista Medicina.

Impreso en ZLOTOPIORO S.A.C.I.F., Sarmiento 3149 - Bs. Aires, Argentina

Nuevo tratamiento de la hipertensión arterial leve y moderada

NAP-SIVAL®

Antihipertensor
Regulador iónico
de la pared arterial.
1 gragea por día.
Envases con 10 y 30
grageas.

"Bajo fórmula de
Les Laboratoires Servier
Francia."

analgésico de alto poder

FLOVACIL®

mayor potencia analgésica
efecto más duradero
mejor tolerancia
un resultado redondo

Indicaciones: *Tratamiento del dolor: osteoartritis, dolores postoperatorios, afecciones reumáticas, odontalgias, dolores postraumáticos, etc.*

Fórmula: *Cada comprimido recubierto contiene: Acido 2', 4' -difluoro-4-hidroxi-3-difenil-carboxílico (DIFLUNISAL) 500 mg.*

Posología y Forma de administración: *Como dosis usual se aconseja administrar 1 comprimido por la mañana y 1 comprimido por la noche. (Salvo indicación facultativa).*

Presentación: *Envases originales de 10 y 40 comprimidos recubiertos.*

Precio al público con IVA al 15-7-81
x 10 comprimidos $ 20.151
x 40 comprimidos $ 74.937

Acciones colaterales y secundarias: *Pueden presentarse síntomas relacionados con el aparato digestivo: epigastralgia, náuseas y vómitos. En raras ocasiones fueron relatadas erupciones cutáneas, hemorragia gastrointestinal y úlcera péptica.*

Precauciones y Advertencias: *La administración simultánea de anticoagulantes puede llevar a una sobredosificación relativa de los mismos debido a la alta afinidad de FLOVACIL por las proteínas plasmáticas.*

Debe evaluarse individualmente su administración en pacientes con insuficiencia renal.

Contraindicaciones: *No debe utilizarse en pacientes con hipersensibilidad al fármaco; asmáticos con antecedentes de crisis desencadenadas por ácido acetilsalicílico u otros antiinflamatorios no esteroides; úlcera péptica en actividad y durante la lactancia.*

No se aconseja su utilización en pacientes embarazadas, especialmente durante el primer trimestre de la gestación.

Andrómaco

FLV-11-A.1

EN INFECCIONES URINARIAS

SISOMINA I.M.

100 mg

DOSIS DIARIA UNICA INYECTABLE

Posología diaria única - infecciones urinarias

Pacientes con función renal normal

SISOMINA		DOSIS DIARIA
100 mg.	Adultos de más de 60 kg.	Una ampolla I.M.
75 mg.	Adultos de 60 Kg o menos	Una ampolla I.M.

DURACION DE LA TERAPIA: Duración usual de la terapia en todas las infecciones es de 7-10 días.

Información para recetar

SISOMINA INYECTABLE—Dosificación diaria única para Infecciones Urinarias.

Indicaciones: Infecciones urinarias causadas por gérmenes sensibles, incluyendo especies de Estafilococo (aún cepas resistentes a la meticilina), Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella-Enterobacter-Serratia, Proteus (indol positivo e indol negativo) y Citrobacter. Se ha demostrado eficacia clínica aún contra cepas resistentes a otros antibióticos.

Contraindicaciones: Pacientes con antecedentes de hipersensibilidad a la Sisomina Inyectable y aquellos con cualquier grado de insuficiencia renal.

Precauciones: Debe evitarse la administración concomitante de Sisomina Inyectable con diuréticos potentes, agentes bloqueadores neuromusculares y otras drogas conocidas por su toxicidad renal o neurotóxica.

Dosificación: La Sisomina puede administrarse por vía I.M. en una dosis diaria única por 7-10 días a pacientes adultos con función renal normal. Para adultos que pesan más de 60 kg., la dosis diaria única de Sisomina es una ampolla de 100 mg. Para adultos que pesan 60 kg., o menos la dosis diaria única de Sisomina es de una ampolla de 75 mg.

Este resumen contiene solamente información básica para recetar. Información más completa es disponible a solicitud de los señores médicos.

	Precio setiembre '81	
Sisomina	75 mg 2 amp. x 1,5 cc	$ 55.831
Sisomina	100 mg 1 amp. x 2 cc	$ 36.887

Referencias

1. Stone, H. H. et al.: Ann. Surg. 183:660 (June), 1976.
2. Medical Research Files, Schering Corporation, U.S.A.
3. Madsen, P. O.: Efficacy and Tolerance Study of Sisomicin in Urinary Tract Infections: Comparison on Once Daily and Twice Daily Adminisitration. Presented at 9th Int. Cong. Chemotherapy. London 1975.
4. Dale & Cox. C.: Efficacy and Tolerance Study of Sisomicin in Urinary Tract Infections: Comparison on Once Daily and Twice Daily Administration. Presented at 9th Int. Cong. Chemotherapy. London 1975.
5. Thompson, I.: Efficacy and Tolerance Study of Sisomicin in Urinary Tract Infections: Comparison of Once Daily and Twice Daily Administration. (En imprenta.)

ESSEX (ARGENTINA) S.A.I.C.
con licencia de
SCHERING CORPORATION U.S.A.
Kenilworth, New Jersey

MARCA DE FABRICA

Stugeron
JANSSEN
forte

Antiespasmógeno vascular y sedante laberíntico.

Permite una mayor continuidad y consecuentemente una mejor respuesta clínica en el tratamiento de la patología vascular.

Producido bajo licencia de
JANSSEN PHARMACEUTICA n.v.
Beerse Belgica

Precio de Venta al Publico al 21-4-81

Envase de 30 comprimidos $ 32 568
Envase de 60 comprimidos $ 62 624
Envase de 100 comprimidos $ 91 158

Elaborado por
Johnson & Johnson
de Argentina S.A. Comercial e Industrial
Darwin 471 - Buenos Aires

ISSN 0025-7680

MEDICINA

BUENOS AIRES

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

VOL. 41, Nº 6 **1981**

HIPERTENSION
Nuevo concepto

TRANDATE
200
(labetalol)

Unica monodroga α β Bloqueante
de acción simultánea

Glaxo

Precio al público al 22/4/81 - Trandate 100 mg por 20 comp. $ 30.649; 100 mg por 50 comp. $ 73.003; 200 mg por 20 comp. $ 58.298; 200 mg por 50 comp. $ 139.925.

MEDICINA

(BUENOS AIRES)

VOLUMEN 41 AÑO 1981

INDICE GENERAL DEL TOMO 41

Número 1

ARTÍCULOS ORIGINALES (ORIGINAL ARTICLES)

Número 3

ARTÍCULOS ORIGINALES (ORIGINAL ARTICLES)

CASUÍSTICA (CASE REPORT)

REUNIÓN ANATOMOCLÍNICA (CLINICOPATHOLOGICAL CONFERENCE)

ADELANTOS EN MEDICINA (ADVANCES IN MEDICINE)

ARTÍCULO ESPECIAL (SPECIAL ARTICLE)

EDITORIALES (EDITORIALS)

CARTAS AL COMITÉ DE REDACCIÓN (LETTERS TO THE EDITOR)

Número 4

ARTÍCULOS ORIGINALES (ORIGINAL ARTICLES)

Número 6

Suplemento (Supplement)

XXV ANIVERSARIO (XXV ANNIVERSARY)

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLOGICAS

"MARIANO R. CASTEX"

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA DE BUENOS AIRES

CITOGENÉTICA (CYTOGENETICS)

MEDICINA

LEUCEMIA EXPERIMENTAL (EXPERIMENTAL LEUKEMIA)

COAGULOPATÍAS (COAGULOPATHIES)

EDITORIALES (EDITORIALS)

[redacted]

La decisión en Ajedrez: el Rey.
La decisión en Aminoglucósidos

Baymicina®

(Sisomicina Bayer)

Hasta 4 veces más eficaz que gentamicina

PRESENTACIONES:

Como Solución al 5%

Baymicina® 100: envase de 2 ampollas de 2 ml. con 100 mg. de sisomicina cada una.

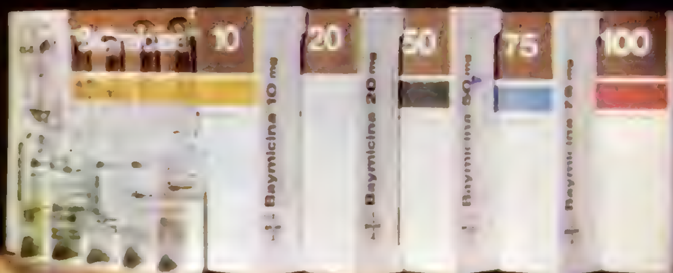
Baymicina® 75: envase de 2 ampollas de 1,5 ml. con 75 mg. de sisomicina cada una.

Baymicina® 50: envase de 2 ampollas de 1 ml. con 50 mg. de sisomicina cada una.

Como Solución al 1%

Baymicina® 20: envase de 2 ampollas de 2 ml. con 20 mg. de sisomicina cada una.

Baymicina® 10: envase de 2 ampollas de 1 ml. con 10 mg. de sisomicina cada una.



Bayer Argentina S.A.
División Farma
Empedrado 2435 - Buenos Aires/Argentina

Precio indicativo al publico envase x 2 ampollas de 10 mg. $ 9.757.- (al 17.2.81)

MEDICINA

BUENOS AIRES

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

ARGENTINE SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION

XXVI Scientific Reunion, Mar del Plata, november 7 to 10, 1981

SPECIAL ARTICLE

EDITORIALS

LETTERS TO THE EDITOR

VOL. 41, Nº 6 **1981**

línea de psicofármacos

Labinca

esfuerzo argentino
para una salud mejor

NEUROZEPAM ®

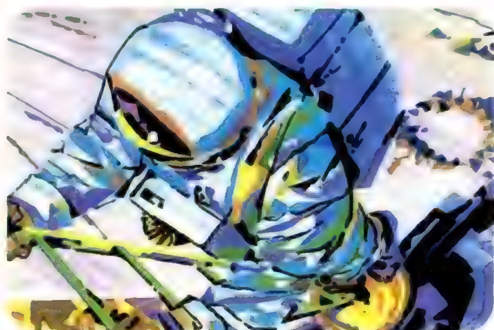
(bromazepam)

Control de las distimias

INDICACIONES: **Inestabilidad o desequilibrio emocional. Irritabilidad. Agresividad. Agitación motriz. Tensión psíquica. Trastornos del sueño. Temores. Obsesiones. Neurosis de angustia, de ansiedad o emotiva, neurasténica, fóbica, histérica, obsesiva. Manifestaciones hipocondríacas. Labilidad psíquica senil.**

POSOLOGIA: 1,5 a 3 mg; 2 ó 3 veces por día.

Precios al 22/6/81 con I.V.A. al público
NEUROZEPAM 3 mg. x 20 comp. $ 20.149
NEUROZEPAM 3 mg. x 50 comp. $ 41.305
NEUROZEPAM 6 mg. x 20 comp. $ 29.285
NEUROZEPAM 6 mg. x 50 comp. $ 60.036



JUSTUM ® 5 y 10 mg

(clorazepato dipotásico)

Tranquilidad dinámica

INDICACIONES: **Trastornos emocionales (angustia y ansiedad, irritabilidad, trastornos afectivos, hiperemotividad, fobias, neurosis obsesivas), trastornos psicosomáticos.**

POSOLOGIA: 3 a 4 comprimidos por día.

Precios al 22/6/81 con I.V.A. al público
JUSTUM 5 mg. x 20 comp. $ 16.482
JUSTUM 5 mg. x 50 comp. $ 37.752
JUSTUM 10 mg. x 20 comp. $ 23.997
JUSTUM 10 mg. x 50 comp. $ 53.814

PRIMUM ®

(flunitrazepam)

Serenidad en la noche - Plenitud al despertar

INDICACIONES: **Todas las formas clínicas de insomnio, de cualquier etiología. Trastornos de la iniciación, trastornos de la continuidad, despertar precoz. Sueño liviano.**

POSOLOGIA: Adultos: 1/2 a 1 comprimido al acostarse. En caso necesario puede ser aumentada a 2 comprimidos. Menores de 15 años: 1/4 a 1/2 comprimido.

Precios al 22/6/81 con I.V.A. al público
PRIMUM x 10 comp. $ 16.267
PRIMUM x 30 comp. $ 43.470

VEGESTABIL ®

(sulpirida + clorazepato dipotásico)

Cobertura psicosomática integral

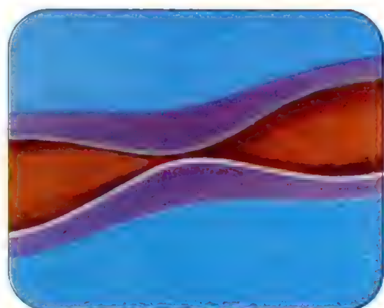
INDICACIONES: **Estados de tensión psíquica, neurosis con manifestaciones psicosomáticas, organoneurosis, distonías neurovegetativas, distimia con manifestaciones somáticas a nivel de los distintos aparatos y sistemas y todo otro tipo de trastornos psicosomáticos: mareos, vértigos, cefaleas, espasmos musculares, etc.**

POSOLOGIA: 2 a 4 comprimidos por día. En pacientes psiquiátricos estas dosis pueden llegar a duplicarse.

Precios al 22/6/81 con I.V.A. al público
VEGESTABIL x 20 comp. $ 27.701
VEGESTABIL x 50 comp. $ 63.619

• PROBADA EFICACIA EN 5 AÑOS DE USO CLINICO, EN MAS DE 4 MILLONES DE PACIENTES EN TODO EL MUNDO: (1)

EN ANGINA DEBIDA A ESPASMO CORONARIO

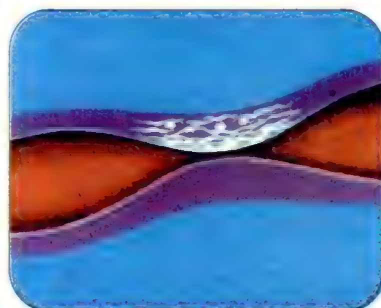


- Total cesación de los ataques en el 63% de los pacientes. (4)
- Efectivo aún donde el propanolol y los nitratos fracasan.

COMO DROGA DE PRIMERA ELECCION EN ANGINA DE ESFUERZO (2)

- Reducción de más de 50% en el porcentaje de ataques. (3)
- Aumento en 80% de la tolerancia al esfuerzo. (3)

EN LA COMBINACION DE ANGOR POR ESPASMO Y OBSTRUCCION CORONARIA FIJA



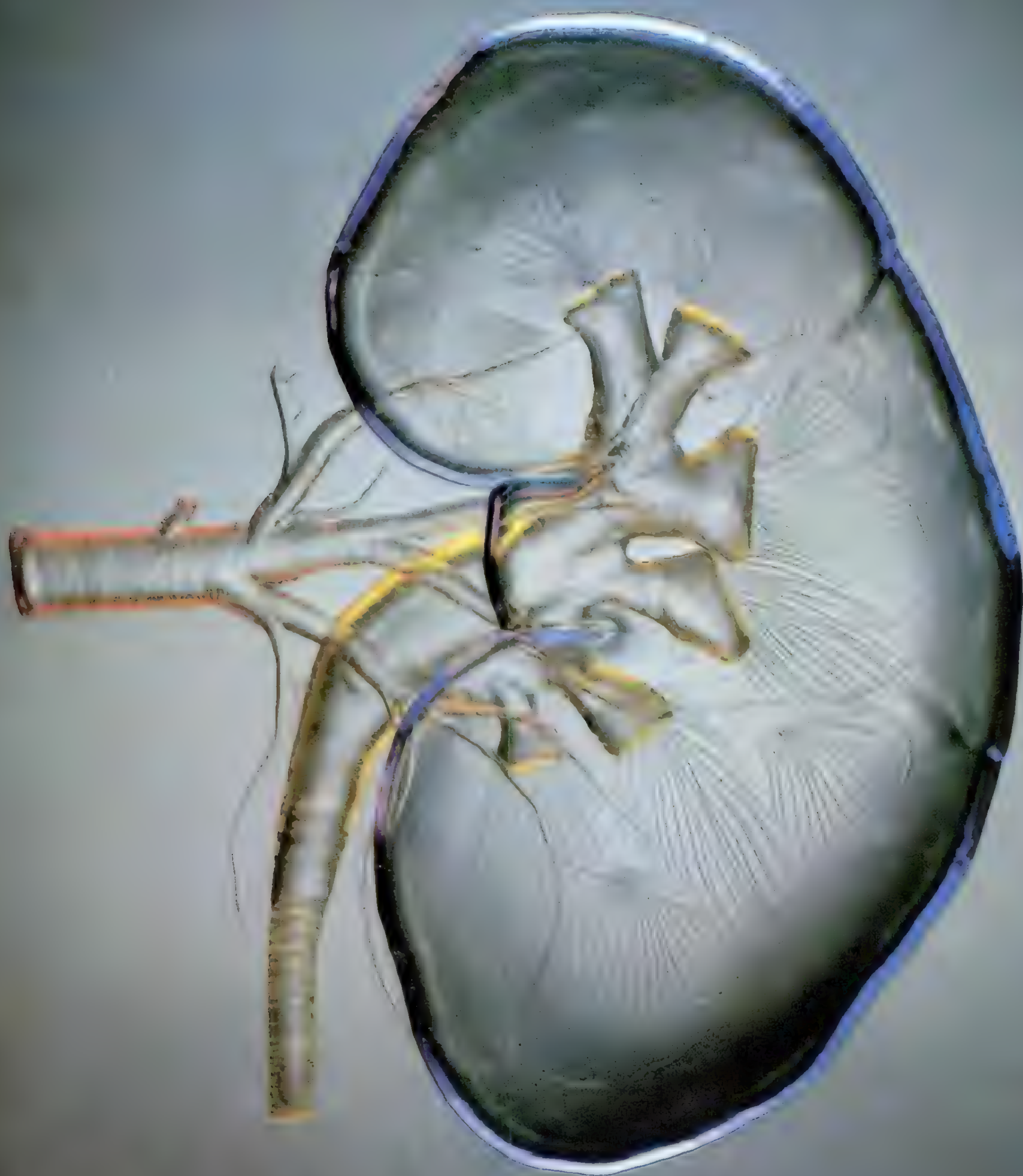
- Efectivo en 73% de los pacientes. (5)

PRESENTACION: Envase de 50 cápsulas de 10 mg de nifedipina.

DOSIS INICIAL: 1 cápsula de 10 mg deglutida entera, 3 veces por día.

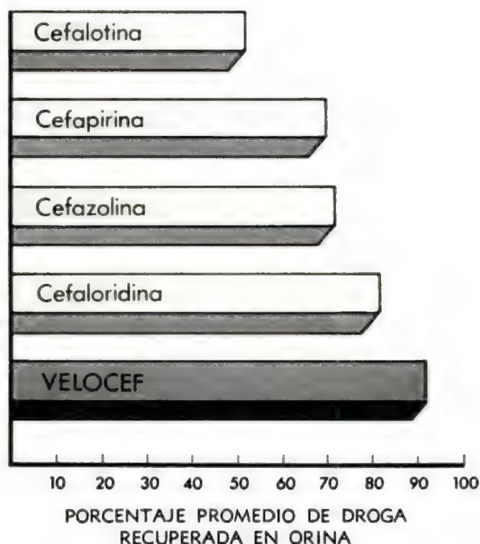
TITULACION DEL PACIENTE AMBULATORIO: El nivel de actividad física del paciente, la frecuencia de ataques y el consumo de nitroglicerina sublingual, pueden servir de guía al médico para incrementar la dosis de 10 mg tres veces por día a 20 mg tres veces al día para luego pasar a 30 mg tres veces por día.
Esta titulación puede ser realizada, en caso de necesidad, cada tres días. En la mayoría de los casos la titulación debe realizarse durante un período de 7 a 14 días, así el médico puede evaluar más adecuadamente la respuesta a cada nivel de dosis de la medicación.

1- Datos en archivo, Departamento Médico, División Laboratorios Pfizer, Pfizer Inc. New York. 2- Stone, P.H.; Antman, E.M.; Muller, J.E.; Braunwald, E.- Ann. Int. Med. 93:886-904, 1980. 3- Mueller HS, Ferst JA, Chahine R: Reporte interno de un estudio doble ciego multicéntrico, placebo-controlado de nifedipina en angina estable crónica. Presentado en el American Association Meeting, Miami, Noviembre 20, 1980.
4- Antman E, Muller J, Goldberg S, et al: Terapia de Nifedipina para espasmo arterial-coronario: experiencia en 127 pacientes. N Engl J Med 302: 1269-1273, Junio 5, 1980. 5- Niitani H, Fujimaki T: Experiencia clínica con nifedipina para las enfermedades isquémicas del corazón en Hashimoto K, Kimura E, Kobayashi T (eds): Ist International Nifedipina Symposium: New Therapy of Ischemic Heart Disease. Tokyo, University of Tokyo Press, 1975, pp268-278.



Penetración tisular:
Un factor decisivo
en las infecciones
del tracto urinario
VELOCEF El factor decisivo

Concentración activa: Cefradina pasa al tracto urinario inferior sin metabolizarse, siendo activa contra los agentes patógenos aun en la vejiga.



VELOCEF posee el mayor grado de recuperación y la menor unión proteica.

Penetración efectiva: La curación o mejoría de los pacientes es, finalmente, el parámetro definitorio.

Porcentaje de pacientes curados o mejorados

	Nº PACIENTES	ORAL	Nº PACIENTES	INY.
Cistitis aguda	775	97 %	58	98 %
Cistitis crónica	182	92 %	19	95 %
Pielonefritis aguda	276	94 %	145	96 %
Pielonefritis crónica	118	88 %	39	92 %
Bacteriuria asintomática	23	91 %	3	100 %
Prostatitis	17	94 %	2	100 %
Uretritis no gonocóccica	9	89 %	1	100 %
Orquiepididimitis	7	100 %	—	—
Infecc. inespecíficas del tracto urinario	517	92 %	54	93 %

VELOCEF
(cefradina)
El factor decisivo

PRECIO PUBLICO CON I.V.A. AL 12-5-81

CAP.: 250 mg x 8 $ 24.248.—, 250 mg x 16 $ 44.582.—, 500 mg x 8 $ 43.490.— y 500 mg x 16 $ 79.482.—; COMP.: 1 g x 8 $ 79.482.—; INY.: 250 mg $ 12.268.—, 500 mg $ 23.327.— y 1000 mg $ 40.849.—; SUSP.: 250 mg x 60 ml $ 36.592.— y 250 mg x 120 ml $ 66.882.—.

SQUIBB

nuevo de Hoechst

PRETOR®

(Cefotaxima)

ARMONIA UNICA ENTRE AMPLITUD DE ESPECTRO, ACTIVIDAD Y TOLERANCIA

- El antibiótico de más amplio espectro.
- Estable frente a las β lactamasas bacterianas.
- Altas concentraciones en los sitios de infección.
- Eficacia y rapidez de acción.
- No altera la función renal.
- Antibiótico de elección, aún cuando los gérmenes no han sido identificados.
- Optima tolerancia en todas las edades.

PRETOR®

NO LE DA UNA SEGUNDA CHANCE A LA INFECCION

PRESENTACIONES

250 Mg 1 Fco. Amp. con 1 Amp. dil. precio 3/81: $ 18.909.-
500 Mg " " " " " " " " " " ": $36.358.-
1 g " " " " " " " " " " ": $69.919.-
2g " " " " " " " " " " ": $127.724.-

nuevo

antibiótico de máxima potencia

cla

foran

- Espectro muy superior al de las cefalosporinas y penicilinas semisintéticas disponibles
- Actividad que desafía a la de los aminoglucósidos
- Resistencia a las β-lactamasas no sobrepasada
- La clásica seguridad de las cefalosporinas
- Altos niveles en plasma y orina
- Porcentajes remarcables de curación clínica en infecciones severas

claforan

nuevo antibiótico de máxima potencia

COMPOSICION: CLAFORAN es Cefotaxime sódico (250 mg; 500 mg; 1 g; 2 g) una nueva molécula antibiótica con el más amplio espectro bactericida frente a gérmenes gram positivos, gram negativos y anaerobios.

PROPIEDADES: CLAFORAN ha demostrado su actividad mediante pruebas in vitro frente a los gérmenes: estafilococos, estreptococos (el Streptococcus faecalis es poco sensible), Streptococcus pneumoniae, Escherichia Coli, Citrobacter, Klebsiellas, Enterobacter sp., Serratia, Proteus (indol positivos e indol negativos), Providencia sp., Haemophilus influenzae, Neisseria. Menos sensibles: Pseudomonas aeruginosa y Bacteroides fragilis.

INDICACIONES: CLAFORAN está indicado en aquellas infecciones simples o mixtas producidas por cepas sensibles de los gérmenes anteriormente citados, tales como infecciones de las vías respiratorias, infecciones urinarias, sepsis, endocarditis, meningitis, infecciones óseas, de las articulaciones, tejidos blandos y de la piel, infecciones de la cavidad abdominal (peritonitis, infecciones de las vías biliares y del tracto gastrointestinal), infecciones otorrinolaringológicas, quemaduras o heridas infectadas, infecciones de los órganos genitales, infecciones en ginecología y obstetricia.

POSOLOGIA Y MODO DE EMPLEO

- Vía intramuscular (CLAFORAN 1000 - CLAFORAN 500 y 250)
  Disolver el CLAFORAN en su ampolla de solvente e inyectar profundamente en la región glútea.
- Vía intravenosa (CLAFORAN 2000; CLAFORAN 1000 CLAFORAN 500 y 250)
  Disolver el CLAFORAN en su ampolla de solvente y después:
  - ya sea inyectar la solución por vía endovenosa directa, lentamente en la vena o en la tubuladura de la perfusión.
  - o utilizar la solución en perfusión continua o discontinua de una duración de 20 a 60 minutos.

La posología, la vía de administración y el ritmo de las inyecciones se eligen en función de la naturaleza y de la severidad de la infección, del estado del enfermo, así como de la sensibilidad de los gérmenes al cefotaxime.

En el adulto:

La posología usual es de 2 g por día, en 2 inyecciones de 1 g.
En los casos más severos, esta dosis se aumentará a 3 ó 4 g por día en 2 a 4 inyecciones.
En los casos sumamente severos, la dosis podrá alcanzar por vía venosa, 12 g por día.

En el niño y en el lactante:

La dosis cotidiana habitual es de 50 a 150 mg/kg, repartida en 2 a 4 inyecciones.
Excepcionalmente, la posología diaria puede alcanzar 200 mg/kg.
La administración en el prematuro está en curso de estudio.
Hasta que se establezca la posología, se recomienda no sobrepasar la dosis de 50 mg/kg/día, en razón de la inmadurez renal.

En el insuficiente renal:

La posología se ajustará modificando, ya sea la dosis unitaria, ya sea el ritmo de las inyecciones, teniendo en cuenta los niveles séricos del antibiótico, la depuración de la creatinina o la creatinina sérica. En pacientes con clearance de creatinina menor de 20 ml/min. la dosis total diaria de Claforan debe disminuirse a la mitad.

PRECAUCIONES DE EMPLEO

Interrumpir el tratamiento en caso de reacción alérgica.
Adaptar la posología en caso de insuficiencia renal orgánica o funcional.
La asociación de medicamentos potencialmente nefrotóxicos y de diuréticos poderosos deberá tener en cuenta los riesgos debidos a estos medicamentos.
En mujeres embarazadas.

EFECTOS INDESEABLES

- Reacciones locales: se han señalado flebitis después de inyecciones endovenosas y dolor en el punto de inyección en las inyecciones intramusculares.
- Reacciones generales: se han observado casos de erupcion cutánea, de fiebre, de eosinofilia, de diarrea, de leucopenia transitoria, de elevación pasajera de las transaminasas TGO y TGP y de las fosfatasas alcalinas.
- La asociación con aminoglucósidos como así también con polimixina B y colistina aumenta la nefrotoxicidad de los mismos.

INTERACCION CON LAS PRUEBAS BIOLOGICAS

Se puede obtener una reacción falsamente positiva cuando se investiga la glucosa en la orina con sustancias reductoras, pero ello no ocurre cuando se utilizan los métodos específicos con la glucosa-oxidasa.

Puede producir alteración de las pruebas de Coombs.

ADVERTENCIAS Y RECOMENDACIONES

- En los sujetos hipersensibles a la penicilina, la utilización del CLAFORAN debe ser prudente siendo necesaria una vigilancia médica estricta desde la primera inyección.
- En la mujer embarazada, la seguridad de empleo no ha sido establecida, a pesar de que en la experimentación animal no se ha puesto en evidencia efecto teratogénico.
- No se debe mezclar el CLAFORAN con ningún otro antibiótico en la misma jeringa o la misma perfusión.
- Utilizar la preparación extemporánea. La estabilidad de una solución de cefotaxime en las soluciones de perfusión (isotónica de Cl Na, glucosa al 5%, solución de Ringer) es satisfactoria durante 24 horas en la heladera y 12 horas a temperatura no mayor de 23°C.
- Conservar los frascos de CLAFORAN al abrigo de la luz y el calor.

CONTRAINDICACIONES

Está contraindicado en los sujetos alérgicos a las cefalosporinas. Puede existir alergia cruzada con la penicilina.

EFECTOS TOXICOS, ANTAGONISMOS, ANTIDOTISMOS

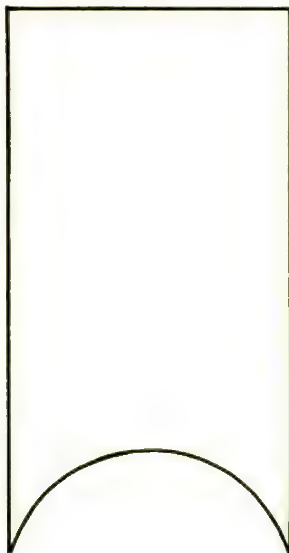
No se conocen.

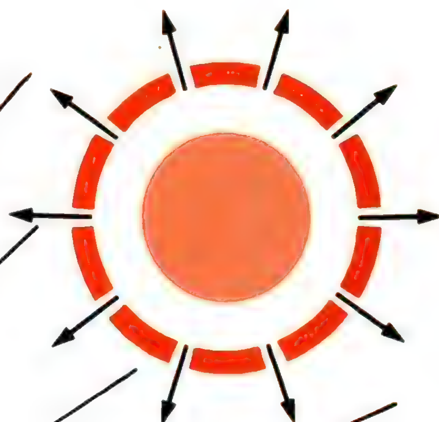
ROUSSEL

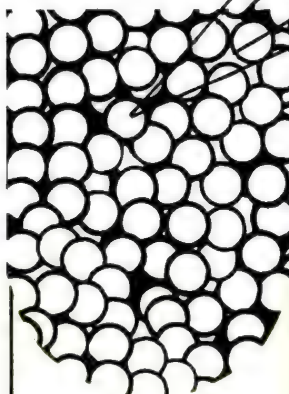
Avellaneda 2202 - (1636) OLIVOS (B.A.) - 791-8011/16 y 9041/4

nitroprontan®

NITROGLICERINA







nitroprontan®

NITROGLICERINA
DE ACCION PROLONGADA

NITROPRONTAN ANTIANGINOSO ESPECIFICO DE LIBERACION PROGRAMADA QUE ASEGURA 24 HORAS DE CARDIOPROTECCION. ACCION TERAPEUTICA: antianginoso de acción prolongada. FORMULA: cada cápsula contiene 2,5 mg de nitroglicerina en microgránulos de liberación lenta. INDICACIONES: profilaxis y tratamiento de los trastornos de la circulación coronaria. Angina de pecho. Síndrome intermedio. Terapéutica de rehabilitación luego del infarto del miocardio. POSOLOGIA: una cápsula por la mañana y otra por la noche, antes de acostarse. En caso necesario se podrá tomar 3 cápsulas al día con intervalos de 8 horas. CONTRAINDICACIONES: Shock circulatorio. Glaucoma. PRESENTACION: envases de 20 y 60 cápsulas.

BOEHRINGER ARGENTINA S.A.
Viamonte 2213/15 Buenos Aires

SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

XXVI REUNION CIENTIFICA

MAR DEL PLATA, DEL 7 AL 10 DE NOVIEMBRE DE 1981

DISCURSO DEL PRESIDENTE DE LA SOCIEDAD

Por el Dr. VICTOR E. NAHMOD

Es para mí un privilegio presidir la Vigésima Sexta Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Sociedad creada por un grupo de científicos liberales que tenían como norte, el diseminar y promover en todo el país la aplicación de la metodología científica para sus observaciones clínicas. Como liberales, buscaron afanosamente la cooperación y la combinación de esfuerzos de distintos grupos de investigadores, prescindiendo de todo tipo de discriminación, con la finalidad de ampliar, fomentar e intensificar la asociación de diferentes grupos de trabajo. Imbuidos por la influencia de nuestro más preclaro hombre de ciencia, como lo fue don Bernardo Alberto Houssay, y apoyados por una Universidad autónoma, crearon las bases y observaron el crecimiento progresivo de esta Sociedad, que se transformó hace diez años en una de las más importantes sociedades científicas del país. Esto se produjo porque la Sociedad perdió el carácter específico de investigadora de problemas clínicos y se transformó en una sociedad de investigaciones biomédicas generales. Aunque esto tal vez fue fructífero no respondió a los planes originales de los fundadores, sino a circunstancias fortuitas.

¿Por qué ocurrió ésto? Para encontrar una explicación racional a este interrogante tendremos que retroceder algo más de cincuenta años y analizar el carácter de nuestra Universidad, licencia que me tomo por tener treinta años de vida universitaria activa.

Julio V. González en su libro *La Universidad* dice: "Hace diez años el pedagogo italiano Giovanni Calo, que estuvo dos meses en Buenos Aires, apuntaba las fallas que había encontrado en nuestra enseñanza superior. Dijo en *La Nación*, del 23 de julio de 1932, que la "Universidad argentina necesitaba elevar su nivel científico y que una de las formas para obtenerlo consistía en establecer la distinción del fin profesional, hoy prevalente, del científico que deberá ser el fin de la Universidad". Para que comprobemos hasta qué punto se ha difundido y arraigado este juicio, cito la confirmación que del mismo ha hecho el doctor Bernardo Houssay, profesor y hombre de ciencia de alto prestigio. En su opúsculo de 1941 sobre función social de la Universidad, afirma en efecto que, "más que universidades propiamente dichas, tenemos conglomerados de facultades profesionales", afirmación que tiene vigencia aún para la Universidad actual.

La carencia de investigadores clínicos se debe al hecho de que las modificaciones producidas en 1956 que orientaron una Universidad científica afectaron en la Facultad de Medicina solamente a las materias básicas y no a las materias del ciclo clínico, con una única excepción: la que corresponde a la cátedra de uno de los fundadores de esta Sociedad, el profesor Alfredo Lanari. Si se pretende formar profesionales no son necesarias las universidades, sólo se necesitan instituciones de enseñanza superior. De la Universidad deben egresar científicos que puedan elegir de acuerdo a su vocación entre una ca-

rrera científica académica o profesional.

Los dos liberales máximos de nuestra historia, Juan Bautista Alberdi y Domingo Faustino Sarmiento, uno por su contribución a la Constitución Nacional y el otro por haber dado una apertura a la inmigración laboral y científica en el país, consideraban que la mayor riqueza de una nación es su gente. Por lo tanto un país debe ser poblado y educado. Si equiparamos nuestro país con las naciones desarrolladas, la Argentina carece hoy de alrededor de 75 000 científicos para las distintas ramas de la ciencia, y esto no sólo se debe a que parcialmente la Universidad no los forma sino que, incluso, aquellos formados y perfeccionados en el exterior encuentran tantas dificultades para su desenvolvimiento en nuestro medio, que emigran. Esta carencia de científicos produce una enorme soledad y una disminución crítica del impulso y la productividad de los pocos que subsisten impidiendo, por lo tanto, el normal desarrollo y progreso de nuestra nación. Cuando un país cuenta con un número suficiente de científicos que trabajan en un medio adecuado se observa una mayor fecundidad y, como dice Baudelaire, "el hombre se siente, él mismo, más espiritual y más justiciero, en una palabra, más noble".

Operativamente ¿cómo solucionar el problema de la falta de científicos y de una investigación clínica de alto nivel? Esto no puede separarse del problema universitario. Una mirada retrospectiva a los años 1956-58 nos podría dar una respuesta: extender la selección de profesores universitarios de adecuado nivel científico a las materias del ciclo clínico. La Universidad actual reviste tal mediocridad en este ciclo que, salvo algunas excepciones, los encargados de cátedra perpetuarían el sistema actual si ellos fueran los únicos integrantes de un jurado. Por lo tanto, considero que la solución reside en ocupar las cátedras con investigadores formados, con dedicación exclusiva, seleccionados por jurados nacionales e internacionales de conocida solvencia científica, y estimular la inmigración de los mejores científicos argentinos y extranjeros. Esto cambiaría la perspectiva oficial en cuanto al real requerimiento de estudiantes que deben ser formados por la Universidad y el número de posiciones para científicos en la Universidad, en instituciones oficiales y en las instituciones privadas, porque, en definitiva, depende de la imaginación y del esfuerzo de los científicos la creación de nuevas fuentes de trabajo productivas.

La real dimensión del significado de la investigación clínica puede leerse en una vieja cita de Cresson Stiles de 1865: "No es a la mera experiencia clínica a la que debemos buscar para la revelación de las leyes de la enfermedad. Las leyes de la química no fueron descubiertas en medio de incendios ardientes o rocas deshechas. Las leyes de la hidrostática y de la hidráulica no fueron reveladas en los torrentes, mareas o corrientes oceánicas, ni las de las neumáticas y la electricidad en los vientos, las trombas y las tormentas. Mucho menos podría esperarse racionalmente que las leyes de la patología fueran descubiertas en la mucho mayor complejidad y los múltiples conflictos de elementos que se presentan ante el médico junto al lecho de un enfermo o un moribundo. Es en el laboratorio y mediante experimentos diseñados artificialmente que la clave ha sido eventualmente recogida y encendida la antorcha que nos guía a través de los laberintos que esconden los secretos de la Naturaleza".

Quiero terminar repitiendo algo que le escuché decir al profesor Stoppani hace muy poco y que cito, espero, de manera aproximada: "Un científico puede ser un mal docente; sus clases pueden ser aburridas, carecer de elegancia y fluidez, puede ser incluso tartamudo... Sin embargo es superior a un profesor que no sea científico. Esto se advierte cuando un estudiante lo encara y le hace una pregunta. La respuesta será siempre algo especial, único, iluminador; algo que abre un camino".

RESUMENES DE LAS COMUNICACIONES

1

Estudio de los sistemas de coagulación y complemento en el mono Callithrix jacchus *infectado con virus Junin*

Felisa C. Molinas, Elda Giavedoni, M. A. Calello, Mercedes C. Weissenbacher

Instituto de Investigaciones Médicas y Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Estudios previos mostraron que el mono *Callithrix jacchus* infectado con virus Junin presenta alteraciones hematológicas similares (leucopenia, trombocitopenia, hemorragias) a las descriptas en los pacientes con Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) y en el modelo experimental en el cobayo. Con el objeto de conocer las alteraciones de la hemostasia responsables del cuadro hemorragíparo y de investigar la participación de sistemas interrelacionados, se evaluaron en el *C. jacchus* infectado con virus Junin, los sistemas de coagulación y complemento. Se efectuó el estudio en 14 monos, de los cuales 10 fueron inoculados con 1000 DL_{50} del virus, cepa patógena XJ, y 4 se usaron como controles normales. Los animales fueron sacrificados los días 7, 14, 17 y 22 postinfección (pi) y simultáneamente los mismos días se sacrificó un mono normal. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca. El recuento de plaquetas efectuado por el método de Brecher y Cronkite dio en 13 animales normales un valor de 446 000 ± 129 000/mm^3. Los valores pi fueron los siguientes: día 7, 286 000 ± 53 900; día 14, 172 000 ± 85 000; día 17, 172 000 ± 65 000· día 22, 24 000. El estudio de coagulación no mostró cambios los días 7 y 14 pi. El día 17 pi se halló acortamiento del PTTK (36 seg) con aumento de los factores VIII (192.6 %) y VII-X (266.6 %). El día 22 pi el PTTK se prolongó a 50.7 seg y descendieron los niveles de los factores: F XIII, 56 %; F II, 76 %; F V, 78 %. El F VII-X bajó también pero dentro de niveles altos, 140 %. El tiempo de trombina se halló prolongado inicialmente (VN: 21 seg; día 14 pi: 50 seg). El nivel del fibrinógeno aumentó los días 17 y 22 pi hasta 909 mg/dl y los productos de degradación del fibrinógeno (PDF) alcanzaron valores hasta 24.4 μg/ml los mismos días. El tiempo de Quick y las α2 macroglobulinas no presentaron modificaciones significativas. Los valores de complemento encontrados (expresados en unidades CH_{50}) fueron: monos normales, 99.5; monos infectados: día 7, 58.3; día 14, 165.1; día 17, 123; día 22, 107.2. La determinación de C_3 antigénico mostró modificaciones concordantes con la del complemento total. Las alteraciones de coagulación y complemento halladas en el mono *C. jacchus* infectado con virus Junin difieren de lo descripto en humanos y en el modelo experimental en el cobayo. En estos últimos se encontró que las alteraciones de coagulación y complemento aparecen en forma simultánea. En cambio, en el *C. jacchus* se halló que la activación de complemento antecede a las alteraciones de coagulación. Estas últimas se caracterizan por presentar un fenómeno similar al de un "rebote" el día 17 pi, seguido de probable activación el día 22 pi. No se tiene evidencia cierta de activación de la coagulación porque la concentración del fibrinógeno aumentó en los últimos días pi y el nivel de PDF se modificó muy levemente.

2

Evaluación de IgG asociada a la membrana plaquetaria en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico

María S. Acciaresi, Felisa C. Molinas

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Los pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) pueden presentar trombocitopenia en algún momento de la evolución de la enfermedad. Los mecanismos probables de esta trombocitopenia podrían ser: 1) inmunológico, vinculado a la existencia de un anticuerpo antiplaquetario de manera similar a lo descripto en pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), o bien por la existencia de complejos inmunes circulantes que se fijarían a la membrana plaquetaria de manera inespecífica (al receptor Fc plaquetario); 2) Por alteración de la producción de plaquetas por los megacariocitos. Karpatkin y col. (1969) utilizando un método indirecto para evaluar la existencia del anticuerpo, hallaron en el 80 % de los pacientes con LES un factor antiplaquetario independiente del número de plaquetas. Los métodos actuales para demostrar el anticuerpo antiplaquetario se basan en la cuantificación de IgG asociada a la membrana plaquetaria. Estos métodos no pueden discriminar si esta IgG es un anticuerpo antiplaquetario o si forma parte de un complejo inmune. El objetivo de este estudio fue evaluar el mecanismo inmunológico de la trombocitopenia en pacientes con LES. Se estudiaron 24 enfermos con LES, 24 controles normales y 8 pacientes con PTI. Para la detección de IgG unida a la plaqueta se utilizó el método de Leporrier y col. (1979), que consiste en emplear anti-IgG marcada con peroxidasa. La fijación y cuantificaciónde peroxidasa se reveló por medio de una reacción enzimática usando ortodianizidina-H_2O_2. El recuento de plaquetas se efectuó por 2 métodos: el de Brecher y Cronkite y utilizando el Thrombocounter. De los pacientes con LES 18 tenían valores de plaquetas por encima de 150 000/mm^3 (202 000 $\pm$ 9 000), y 6 pacientes tenían trombocitopenia que oscilaba entre 132 000 y 36 000/mm^3 (75 400 $\pm$ 20 000). Los resultados de IgG asociado a la membrana plaquetaria fueron los siguientes: controles normales, 181.70 $\pm$ 22.67 moléculas de IgG/plaqueta; pacientes con LES, 242.38 $\pm$ 38.86 molec IgG/plaqueta; pacientes con PTI, 252.92 $\pm$ 643.54 molec IgG/plaqueta. En los 6 pacientes con LES trombocitopénicos el valor fue de 387.4 molec IgG/plaqueta. Se halló una correlación inversa significativa entre el número de plaquetas y la cantidad de IgG asociada a la membrana en los pacientes con LES ($r: -0.629$, $p < 0.01 > 0.001$) y no significativa en los pacientes con PTI ($r: -0.467$). En conclusión, en los pacientes con LES la trombocitopenia se produciría por un mecanismo inmunológico de naturaleza aún no clara, pues si bien se encontró una buena correlación entre la severidad de la trombocitopenia y la cantidad de IgG asociada a la membrana, el valor de IgG es bajo en comparación a lo hallado en los pacientes con PTI. Además, a diferencia de lo descripto anteriormente, los enfermos con número normal de plaquetas tienen cantidad normal de IgG asociada a la membrana plaquetaria.

3

Inmunidad celular y poblaciones linfocitarias en la Fiebre Hemorrágica Argentina experimental

Guadalupe Carballal, J. R. Oubiña, Silvia Rondinone, B. Elsner, M. J. Frigerio

Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC)

El linfotropismo de la cepa XJ del virus Junin en el cobayo infectado experimentalmente se demuestra por la presencia de antígenos virales, efecto citopático severo y elevados títulos de virus en órganos del sistema linfático. Se ha descripto una acentuada depresión de la respuesta humoral a los eritrocitos de carnero, así como también al virus Junin. El objetivo de este estudio fue determinar si la respuesta inmune celular estaba también modificada y cuáles poblaciones linfocitarias estaban afectadas.

Se inocularon cobayos con 1000 DL_{50} de la cepa XJ de virus Junin, por vía IM sacrificándolos a los 9 y 11 días postinfección. Se determinaron rosetas E y EAC, en sangre periférica, ganglio y bazo y se estudió la respuesta cutánea al PPD en cobayos sensibilizados con la cepa DT de *Mycobacterium tuberculosis* y luego infectados con el virus. Se utilizaron como controles cobayos sensibilizados y no infectados y no sensibilizados e infectados. Se observó: *a)* Reducción en el número total de células linfoideas en bazo ($[\bar{x} \pm ES]. 10^6/$ órgano de controles versus infectados): 1.258 ± 202 vs 379 ± 118 ($p < 0.01$) y ganglio: 19.6 ± 5.6 vs 12.2 ± 2.8 ($p < 0.2$). *b)* Marcada disminución en valores absolutos y porcentuales de linfocitos T (rosetas E) en bazo: 289 ± 91 vs 56 ± 18 ($p < 0.01$), ganglio: 5.9 ± 1.3 vs 2.8 ± 0.7 ($p = 0.05$) y sangre periférica $[\bar{x} \pm ES/ml]$: 1.169 ± 163 vs 457 ± 128 ($p < 0.001$). *c)* Disminución en el número absoluto de linfocitos B (rosetas EAC) en sangre periférica: 264 ± 32 vs 133.5 ± 47 ($p < 0.05$), ganglio: 6.2 ± 1.5 vs 3.1 ± 0.8 ($p < 0.1$) y bazo: 434 ± 110 vs 87 ± 31 ($p < 0.01$) aunque no se observaron cambios porcentuales de estas células. *d)* Disminuida o nula reacción al PPD en los animales sensibilizados e infectados comparada con una respuesta positiva en los mismos, previa a la infección viral, así como en los animales sensibilizados y no infectados. Estos hallazgos indicarían que la cepa XJ de virus Junin daña los mecanismos de inmunidad celular en el cobayo infectado experimentalmente. Se discute su implicancia en la fisiopatogenia de la enfermedad.

4

Infección de Callithrix jacchus *con una cepa atenuada del virus Junin ($XJCl_3$)*

Silvia N. Rondinone, Mercedes C. Weissenbacher, María M. Ávila, Lucía B. de Guerrero, Elba L. Weber, M. J. Frigerio

Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

En trabajos anteriores se demostró que la inoculación al cobayo de la cepa atenuada $XJCl_3$ obtenida por clonado de la cepa XJ prototipo del virus Junin no produce alteraciones de importancia en los mismos salvo una leve plaquetopenia en el día 11 postinfección (pi). No se observa hipertermia ni viremia detectable y la diseminación viral está restringida sólo a algunos órganos. Por otra parte induce la formación de anticuerpos neutralizantes y otorga una sólida inmunidad ante el desafío con la cepa patógena. La cepa $XJCl_3$ ha sido también utilizada en la vacunación de voluntarios en los cuales indujo escasos signos clínicos y una seroconversión que alcanzó el 90 %. Hemos establecido anteriormente que el virus Junin induce en el marmoset *Callithrix jacchus* un cuadro hemorrágico o neurológico mortal con alteraciones hematológicas severas. El objetivo de este trabajo es: *a)* evaluar el comportamiento de la cepa $XJCl_3$ en *C. jacchus*, y *b*) determinar si este primate queda protegido contra un posterior desafío con la cepa patógena del virus Junin. Para el punto *a*) se realizaron dos experimentos con 4 y 3 animales, respectivamente, a los que se les inoculó 5000 DL_{50} vía im de $XJCl_3$. Otros 2 animales inoculados con igual dosis fueron sacrificados a los 14 días pi para determinar la distribución de virus en órganos. Los monos fueron estudiados en forma seriada desde el punto de vista clínico (evaluación del estado general y curva de peso), hematológico y virológico. Los valores hematológicos de hematíes, leucocitos, plaquetas, hemoglobina, hematocrito y fórmula leucocitaria no mostraron cambios dignos de mención atribuibles al virus. Sólo se observaron variaciones hematológicas individuales comunes en esta especie animal. En sangre comenzó a detectarse virus a los 6 días pi con títulos superiores a 2.5 DL_{50}/ml, alcanzando entre los días 10 a 15 pi un título máximo de 4.4 DL_{50}/ml para luego hacerse negativos a los 23 días pi. En los animales sacrificados a los 14 días pi se observó que el título de virus no superaba las 10^3 DL_{50}/ml en ninguno de los órganos estudiados. Para el punto *b*), o sea evaluar el poder inmunizante de la cepa XJC13 se inocularon 3 *C. jacchus* con 5000 DL_{50} de esta cepa. Los animales fueron observados hasta los 60 días pi momento en el cual fue-

ron desafiados, junto con 2 monos normales que sirvieron de control con 10^3 DL_{50} de la cepa patógena XJ. Los animales del primer grupo no mostraron (ni antes ni después de la infección con la cepa patógena y hasta los 30 días postdesafío) signos clínicos de enfermedad. No se observaron alteraciones hematológicas atribuibles al virus ni presencia de virus en sangre. Los anticuerpos neutralizantes comenzaron a detectarse a partir de los 18 días pi con títulos de 1/40 alcanzando a los 60 días pi, momento del desafío, títulos de 1/1000. En los dos animales controles infectados con la cepa XJ se comenzaron a observar signos de anorexia y depresión a partir del día 14 pi y un descenso significativo del peso a partir del día 16 pi. La viremia fue positiva desde el día 7 pi hasta la muerte de los animales. El análisis hematológico reveló trombocitopenia, anemia y leucopenia después de la segunda semana pi. Los resultados de este estudio preliminar indicarían la ausencia de virulencia de la cepa $XJCl_3$ en este modelo experimental sensible al virus Junin. Se demostró también que los animales inoculados con $XJCl_3$ quedan protegidos contra una ulterior descarga con la cepa patógena.

5

Estudio inmunocitoquímico del antígeno Junin y de GFAP (glial fibrillary acidic protein) *en la encefalitis del ratón por virus Junin*

E. F. Lascano, María I. Berría

Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Los aspectos histológicos y ultraestructurales de la encefalitis del ratón por inoculación intracerebral de virus Junin, ya han sido descriptos. Esencialmente, se caracterizaban por marcada congestión acompañada de discreto exudado perivascular de linfocitos, macrófagos y polinucleares neutrófilos. En los ratones moribundos se agregaba proliferación de la microglia. Los estudios ultraestructurales mostraban degeneración de neuronas y astrocitos aislados, en vías de fagocitosis por células oscuras de tipo macrofágico. El presente trabajo completa los anteriores mediante la inmunomarcación enzimática (método peroxidasa/antiperoxidasa) del antígeno Junin y de la GFAP de los astrocitos. Se utilizaron ratones lactantes, de 24-48 horas de vida, inoculados por vía intracerebral con 100 DL_{50} $XJCl_3$ de virus Junin. En el 12º día postinfección, se cosecharon muestras de sistema nervioso central de 22 ratones agónicos. Los títulos infectivos de los encéfalos oscilaron entre $10^{7.5}$ y $10^{7.9}$ DL_{50}/ml. La pesquisa del antígeno Junin y de la GFAP de los astrocitos se llevó a cabo por la técnica PAP. En cada reacción se hicieron correr 3 controles negativos: uno en el que se reemplazó suero anti-Junin por suero normal de conejo; otro en que se empleó suero anti-Junin neutralizado in vitro por virus Junin, y el tercero, en el que se empleó suero anti-Junin sobre sustrato no infectado. Los resultados muestran que el antígeno Junin está localizado, sobre todo, en las neuronas y, en segundo término, en los astrocitos. Las zonas más afectadas son la corteza cerebral en sus áreas frontales, cinguladas y parietales, donde prácticamente todas las neuronas presentan un anillo o media luna de antígeno en el citoplasma. También se observan altas concentraciones de antígeno Junin en el núcleo caudado-putamen, las células piramidales del hipocampo, la capa granulosa del cerebelo, las células de Purkinje y las grandes neuronas de la protuberancia del bulbo, de la médula espinal y de las neuronas de los ganglios raquídeos. La extensa difusión del antígeno viral indica que el Junin afecta masivamente a todas las estructuras del sistema nervioso central cuando se lo inyecta por vía intracerebral. El trabajo incluye la descripción de los cambios acaecidos en la astroglia, revelados por la marcación de GFAP.

6

Purificación de IgA, IgM e IgG de una muestra de plasma humano por fraccionamiento salino y cromatografía de intercambio iónico

M. Aldao, Nélida Lema, M. A. Vides

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas y Laboratorio Central, Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

Son escasos los procedimientos propuestos que permiten obtener IgA, IgM e IgG a partir de una misma muestra de suero o plasma humano. En algunos de ellos determinadas etapas son difíciles de realizar, o el producto obtenido no reune las condiciones de homogeneidad requerida. En este trabajo se propone un procedimiento de purificación de IgA, IgM e IgG a partir de una misma muestra de plasma, aplicando procedimientos de fraccionamiento salino y cromatografía de intercambio iónico. En todas las etapas del procedimiento se controló la pureza de las inmunoglobulinas por inmunodifusión doble e inmunoelectroforesis y la concentración, por inmunodifusión radial simple. El plasma humano, previamente desfibrinado por el agregado de cloruro de calcio, fue deslipidizado con cloruro de manganeso y fosfotungstato de sodio (*J Lipid Res* 11: 583, 1970). Las inmunoglobulinas fueron precipitadas con solución saturada de sulfato de amonio, a una concentración final de 1.8 M. El precipitado fue lavado dos veces con sulfato de amonio 1.8 M redisuelto con tampón de tris-ClH 0.002 M y dializado. La fracción euglobulínica que contiene IgM se separó por centrifugación. El sobrenadante conteniendo IgA e IgG se dializó con tris-ClH 0.075 M pH 7.5. La fracción de euglobulinas disueltas en tampón de fosfato 0.0175 M, se sometió a calentamiento a 56° C por 30 minutos, se dializó, centrifugó y el sobrenadante se cromatografió en una columna de DEAE Sephadex con un gradiente discontinuo de fosfatos de molaridad creciente. El pico eluido a 0.3 M pH 6.5 contenía IgM. La fracción conteniendo IgG en buffer de tris-ClH 0.075 M pH 7.5 se sembró en una columna de QAE Sephadex, y por elución con el mismo buffer se obtuvo IgG pura; un segundo pico que contenía IgA se obtuvo con tris-ClH-cloruro de sodio 0.3 M. Esta fracción se concentró por precipitación con sulfato de amonio 1.8 M. El precipitado redisuelto y dializado en buffer de acetato 0.070 M pH 5 fue aplicado a una columna de QAE Sephadex. La fracción que eluía con el buffer inicial contenía la IgA. La comparación de este método con otros, permite concluir que ofrece ventajas por su simplicidad y el alto grado de pureza de las inmunoglobulinas obtenidas.

7

Estudio inmunogenético de la aptitud de toma y rechazo tumoral en líneas endocriadas de ratas

Laura Urízar, Nelly Amerio, J. C. Morini

División Inmunología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

Se conoce el comportamiento del tumor E 100 en las líneas parentales "m" y "c", e híbridos F_1 (mxc) y F_2 (mc × mc), y se ha demostrado que el carácter toma de tumor se transmite en forma dominante asociado a una alta respuesta a un antígeno no relacionado (GRC) y que responde a la segregación mendeliana de un gene. En este experimento se estudió la aptitud de toma y rechazo, realizándose, para ambos caracteres, selección divergente a partir de F_2, hijos de "tomadores" entre sí ($SD+$) e hijos de "no tomadores" entre sí ($SD-$), para evaluar el tipo de segregación, velocidad de fijación de los mismos en la población y su asociación con la respuesta inmune humoral mencionada. Se midió porcentaje de toma, de regresión y de letalidad, crecimiento tumoral (mm^2 al día 20) y la respuesta a GRC por hemaglutinación directa, expresada como el $\log_2$ de la inversa de la dilución. 1) Porcentaje de toma: a partir de las líneas m, 100 % y c, 40 % ($p < 0.01$), F_1, 100 % y F_2, 82 %, se observó que las líneas divergentes para toma y rechazo presentaron en la 1ª generación, SD_1+: 90.5 % (30/33); SD_1-: 58 % (12/20) $p < 0.05$) y la 2ª generación, SD_2+: 100 % (27/27); SD_2-: 60 % (11/18) ($p < 0.05$). 2) Porcentaje de letalidad: en líneas m y c, 100 y 0 %, respectivamente ($p < 0.001$); en F_2: 95 % (69/73; en SD_1+: 100 % (30/30); SD_1-: 44 % (5/12) ($p < 0.05$); en SD_2+: 100 % (27/27); SD_2- 41 % (4/11) ($p < 0.05$). 3) Crecimiento tumoral (mm^2): línea m: $\bar{x} = 1937 \pm 277$, n = 9; c: $\bar{x} = 508 \pm 279$, n = 19 ($p < 0.001$).

En F_2 se obtuvo: 1498; en SD^+_1: $\bar{x} = 1537 \pm 399$, n = 28; y en SD_1^-: $\bar{x} = 686 \pm 450$ n = 11 ($p < 0.05$; en SD_2^+: $\bar{x} = 1518 \pm 280$, n = 27; y en SD_2^-: $\bar{x} = 991.2 \pm 364$, n = 11 ($p < 0.05$). En la SD^- (generaciones 1 y 2) se manifestaron dos tipos de comportamiento tumoral: crecimiento constante hasta la muerte del animal ($\bar{x} = 1048 \pm 182$; n = 10), o, luego del día 20, regresión hasta la desaparición completa ($\bar{x} = 627 \pm 194$; n = 12), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). 4) Respuesta inmune a GRC: se tomaron en cada caso los picos de respuesta para Ig totales y para Ig G. En Ig totales, el pico en línea m ($\bar{x} = 8.92 \pm 0.61$ n = 27) fue significativamente superior al de línea c ($\bar{x} = 8.13 \pm 0.87$; n = 23) ($p < 0.01$), y el de SD_1^+ ($\bar{x} = 8.75 \pm 1.01$; n = 12) mayor al de SD_1^- ($\bar{x}$ 7.16 $\pm$ 1.34; n = 6) ($p < 0.05$). Con respecto a Ig G, se verificó un nivel más elevado en línea m ($\bar{x} = 7.07 \pm 0.95$; n = 27) con relación al de línea c ($\bar{x} = 6.30 \pm 0.70$; n = 23) ($p < 0.05$), y en SD_1^+ ($\bar{x} = 7.63$ 0.90; n = 11) comparado con el de SD_1^- ($\bar{x} = 6.0 \pm 1.2$; n = 6) ($p < 0.05$). De acuerdo a estos resultados se concluye que: *a)* en la segregación del carácter porcentaje de toma, se observa una marcada divergencia desde la 1ª generación de selección, lo que sugeriría la presencia de pocos genes involucrados en la regulación del mismo; *b)* la línea SD^+ alcanzó el porcentaje de toma límite de 100, pero la SD^- no logró todavía un porcentaje inferior al de la línea original c. Esto sugiere que la fijación del carácter toma de tumor sería más rápida que la del carácter rechazo de tumor; *c)* existe correlación positiva entre porcentaje de toma y tamaño tumoral, como ha sido ya demostrado en otras líneas endocriadas; *d)* la línea seleccionada para toma de tumor presentó títulos de anticuerpos, a un antígeno no relacionado (GRC), significativamente superiores a los de la línea seleccionada para rechazo de tumor, manteniéndose la asociación entre el carácter toma de tumor y mayor nivel de anticuerpos.

8

Encefalitis subaguda en ratas inoculadas con virus Junin

E. F. Lascano, María I. Berría, María M. Ávila, Mercedes C. Weissenbacher

Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Estudios previos mostraron que en las ratas Wistar, inoculadas intracerebralmente a los 2 días de vida con 5000 $DICT_{50}$ de la cepa XJ de virus Junin, se observaba una mortalidad del 15 % hasta los 30 días pi. Durante la segunda semana de infección se lograba recuperar virus de cerebro y altos títulos (10^6 $DICT_{50}$) pero esos valores descendían paulatinamente en el curso de la 3ª semana, hasta desaparecer. Con el objeto de comprobar la existencia o no de una infección persistente en los animales sobrevivientes, se cosecharon encéfalos a los 30, 80, 160 y 280 días pi. Estos materiales fueron destinados a: *a)* aislamiento de virus por método convencional y por cocultivo encéfalo-línea Vero; *b)* detección de antígeno viral por inmunomarcación enzimática con el método peroxidasa/antiperoxidasa (PAP). A los 30 días pi no se recuperó virus del macerado de encéfalo (método convencional) pero sí de la totalidad de los sobrenadantes de los cocultivos. En el mismo período y en todos los animales, el método PAP reveló masiva concentración y amplia distribución del antígeno viral sobre todo en neuronas de corteza cerebral, núcleos de la base, cerebelo, protuberancia y bulbo. A los 80 días pi solo se recuperó virus en una tercera parte de los sobrenadantes de los cocultivos y el método PAP reveló antígeno viral en la misma proporción. A los 160 días ya no hubo recuperación de virus infectivo, pero se continuó detectando antígeno Junin en un tercio de los animales. A los 280 días se observó antígeno en 1 sobre 9 animales estudiados. Se concluye que: 1) en ratas Wistar de 2 días de vida, inoculadas intracerebralmente con virus Junin cepa XJ, se observó encefalitis que se detectó en un tercio de los animales hasta aproxi-

madamente 3 meses pi; 2) esta encefalitis subaguda tendió a desaparecer espontáneamente en el curso del tiempo; 3) el método PAP confirmó su alta sensibilidad para detectar antígeno Junin aun en ausencia de recuperación de virus infectivo; 4) el cocultivo encéfalo-línea Vero mostró evidente superioridad sobre la técnica convencional de recuperación de virus.

9

Virus Junin en cultivo de astrocitos disociados de encéfalo de rata

María I. Berría, E. F. Lascano

Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Los cultivos celulares obtenidos a partir de disociación de encéfalos de embriones de mamíferos originan una población heterogénea de células neuronales y gliales. Con fines de estudios neurobiológicos, se logra una mayor precisión cuando las observaciones se realizan sobre cultivos purificados, sea de neuronas o de células gliales. En ambos casos, es de importancia primordial la precisa identificación del tipo celular presente, recurriendo a parámetros morfológicos, neurofisiológicos, bioquímicos e inmunoquímicos. El objeto del presente trabajo fue caracterizar la propagación del virus Junin en monocapas astrocitarias puras en diferentes etapas de diferenciación celular. Se desarrollaron cultivos a partir de disociación mecánica de encéfalos de embriones de rata, de 16 a 18 días de vida intrauterina. A las 48 horas del primer subcultivo, se agregó factor de maduración glial (FMG) al medio nutritivo de algunos cultivos. En el resto, o sea en las monocapas a las que no se agregó FMG, las células mantuvieron el carácter de inmaduras (elementos chatos y fusiformes, de abundante citoplasma eosinófilo y con ocasionales mitosis). En cambio, en las monocapas a las que se agregó FMG, ya a las 4 horas se observaron modificaciones: algunas células se redondeaban, disminuían de tamaño, presentaban condensación de la cromatina y emitían prolongaciones finas y ramificadas, evidenciando una transformación morfológica de carácter francamente astrocitario. Los cambios se acentuaron con el curso del tiempo, siempre bajo la acción del FMG renovado cada 24 horas. Los concomitantes estudios de inmunomarcación enzimática (método peroxidasa/antiperoxidasa) de PFAP (*glial fibrillary acidic protein*) mostraron una creciente aparición de gliofibrillas en el citoplasma, en concordancia con la diferenciación morfológica astrocitaria que ocurría en función del FMG y del tiempo. En una segunda etapa del trabajo, se realizaron observaciones sobre monocapas astrocitarias, inmaduras y maduradas por FMG, inoculadas con 1000 DL_{50} de cepa XJ clon 3 de virus Junin. En forma periódica, se efectuaron cosechas de sobrenadantes (para titulación de virus infectivo) y de monocapas celulares (para inmunomarcación enzimática de antígeno Junin) con resultados positivos en ambos tipos de monocapas. El sistema in vitro ensayado resultó un modelo adecuado para la evaluación de los efectos directos y primarios del virus sobre el astrocito en diferentes etapas de maduración.

10

El test de inhibición de la adherencia leucocitaria en la enfermedad de Chagas crónica

R. P. Laguens, J. G. Chambó, R. Cabuli, M. Villalobos, A. Bordonava

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Cátedra de Patología II, Facultad de Ciencias Médicas y Servicio de Cardiología del Hospital Interzonal de Agudos General San Martín, La Plata

El test de inhibición de la adherencia leucocitaria constituye uno de los métodos de evaluación de la inmunización contra antígenos tumorales en pacientes con distintas neoplasias, aceptándose que representa una medida de la inmunidad mediada por células. Dado que en nuestro conocimiento no ha sido aplicado previamente en enfermedades parasitarias se realizó el presente estudio en individuos chagásicos. El test se realizó con la técnica de Halliday (*Cancer Research* 39: 625-636,

1979), utilizándose como antígeno un homogenato total de epimastigotes de *T. cruzi* rotos por compresión-descompresión con un contenido de proteínas de 830 mg %. Leucocitos obtenidos de sangre periférica por sedimentación en dextran y sometidos a shock osmótico para lisar los hematíes se resuspendieron a una concentración de 10^7/ml en medio RPMI-1640 conteniendo 10 % de suero bovino fetal; 0.4 ml de suspensión celular se incubó con 0.1 del homogenato de epimastigotes o con 0.1 ml de medio de cultivo de *T. cruzi* durante 30 minutos a 37° C. Los leucocitos así tratados se resuspendieron y se colocaron en hemocitómetros de Neubauer durante 1 h a 37° C, contándose las células de todo el retículo. Luego de lavar las cámaras suavemente con medio de cultivo a 37° C se determinó en los mismos retículos el número de células adherentes. Los experimentos se realizaron por duplicado para cada paciente. Se emplearon 50 pacientes chagásicos en los cuales la enfermedad se diagnosticó por la positividad de 2 de 4 reacciones serológicas. De ellos 9 presentaban signos clínicos de cardiopatía y la mitad había recibido drogas tripanomicidas. Como controles se utilizaron 27 dadores de banco de sangre, 7 pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES), 2 afectos de Artritis Reumatoidea (AR) y 9 con cardiopatía isquémica no chagásica. Se consideró positiva una inhibición de la adherencia leucocitaria mayor o igual al 25 %. En 38 de los 50 individuos chagásicos el test fue positivo observándose que no se modificó en los tratados. Aparentemente se observó una mayor positividad (8/9) en los individuos con cardiopatía que en aquellos sin cardiopatía (27/37). En los controles no chagásicos el test fue positivo sólo en 2 de 27 controles de banco de sangre, en 1 de 9 cardiópatas y en 1 de 9 del grupo de individuos afectos con LES y AR. Estos resultados indican que en el 76 % de los individuos chagásicos existe una inhibición de la adhesión leucocitaria después de la incubación con antígenos de *T. cruzi* significativamente mayor que en los controles sanos o individuos con otras patologías.

11

Caracterización de inmunoglobulinas anti-receptor de FSH

VIOLETA A. CHIAUZZI, SELVA CIGORRAGA, J. C. CALVO, MARÍA EUGENIA ESCOBAR, M. A. RIVAROLA, E. H. CHARREAU

Instituto de Biología y Medicina Experimental y Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Buenos Aires

En estudios previos hemos demostrado en suero de pacientes con síndrome de ovario resistente, la existencia de un inhibidor de la unión de FSH a su receptor. En el presente trabajo se ha caracterizado dicho factor inhibitorio como IgG. En experimentos de competición de la unión de ^{125}I-hFSH a su receptor específico, no se observó paralelismo entre las curvas presentadas por hFSH o el factor inhibitorio, indicando su diferente naturaleza. La actividad inhibitoria acompañó a la fracción de sulfato de sodio (0-50 % de saturación) y fue caracterizada como IgG por cromatografía a través de columnas de DEAE celulosa e inmunodifusión en agar. Evidencias adicionales de su naturaleza de inmunoglobulina, se obtuvieron por la unión selectiva de este material a proteína A-Sepharosa y por su comportamiento en gradientes de sacarosa 5-20 % como una proteína de coeficiente de sedimentación $S_{20,w}$: 7 x 10^{13} segundos, característico de la IgG. Por precipitación con un antisuero específico anti-γ globulina humana desapareció la actividad inhibitoria. Estudios cinéticos indicaron que esta inmunoglobulina se comporta como un inhibidor competitivo irreversible con una Ki aparente = 2.94 x 10^{12} M^{-1}, mil veces mayor que la constante de afinidad para la interacción FSH-receptor: Ka = 3.80 x 10^9 M^{-1}. La concentración circulante fue estimada en el orden de 1 x 10^{-10}M y su presencia podría explicar la resistencia ovárica a esta gonadotrofina.

12

Regulación de la unión de corticosterona en cerebro de ratas adrenalectomizadas por tratamiento con corticosterona

Silvia Tornello, E. Orti, A. F. De Nicola

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

En ratas diabéticas con hiperfunción suprarrenal se ha observado una reducción de la unión de 3H-corticosterona (CORT) en regiones del sistema nervioso central, luego de la adrenalectomía (*J Steroid Biochem* 14: 77, 1981). Con el objeto de dilucidar si esta reducción se debía a la diabetes *per se* o a la acción crónica de la CORT elevada de los diabéticos sobre los receptores, encaramos la presente investigación. Ratas machos o hembras fueron adrenalectomizadas e implantadas con un pellet de CORT de 200 mg sc o bien recibieron CORT en el agua de bebida (80-100 μg/ml) durante 3 semanas; los controles no fueron tratados. Tres días luego de remover el pellet o 24 h luego de suspender la terapia oral, los animales fueron anestesiados y perfundidos por vía intracardíaca con 0.9 % NaCl. El cerebro fue extraído y se disecaron el hipotálamo e hipocampo. Los tejidos fueron homogenizados en buffer Tris 10 mM, EDTA 1.5 mM, DTT 2 mM y glicerol 10 %, y el citosol se preparó por ultracentrifugación a 105 000 g durante 60 min. El citosol fue incubado con 10 nM ^{3}H-CORT durante 4 h a 0-4° C; minicolumnas de Sephadex LH-20 fueron utilizadas para separar el esteroide unido al libre. La implantación de pellets de CORT o la terapia oral con este compuesto redujo significativamente la unión de ^{3}H-CORT en el hipocampo ($p < 0.05$) en un 50 % con respecto a animales adrenalectomizados. Esta reducción se observó utilizando CORT o dexametasona como competidor para determinar la unión inespecífica, eliminándose por consiguiente que la causante del efecto fuera transcortina contaminante del citosol y no el receptor. Esta experiencia fue importante ya que se sabe que la transcortina aumenta por adrenalectomía y disminuye por tratamiento con corticoides (Westphal, 19-71). Los animales pretratados con CORT y con terapia suspendida 24 h antes del experimento, mostraron menor peso del timo, un indicador biológico de la efectividad del tratamiento. La CORT sérica de los animales pretratados con CORT y con terapia suspendida fue muy baja, en el nivel de animales adrenalectomizados y sin tratamiento supletorio. Finalmente, estudios de captación de ^{3}H-CORT in vivo descartaron la ocupación de los receptores por permanencia de la hormona 1 día después de su retiro, ya que la hormona radioactiva, presente en tejidos nerviosos (hipocampo > hipotálamo = corteza) a la hora del tratamiento, no fue detectable a las 24 h de su administración. Estos resultados sugieren que el tratamiento crónico con CORT disminuye sus propios receptores en el cerebro, y que este fenómeno era el responsable de la disminución de la unión de ^{3}H-CORT descrita anteriormente en el cerebro de animales diabéticos con hiperfunción suprarrenal. Las consecuencias de los cambios de los receptores en zonas relacionadas con la retroalimentación negativa, podrían explicar la hiperfunción de la suprarrenal en situaciones de stress crónico.

13

Receptores citosólicos de estradiol en útero de rata: efecto del molibdato

O. Fridman, A. F. De Nicola

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Es conocido el efecto regulador del estradiol (E_2) sobre sus propios receptores en útero de rata. Esta acción podría involucrar síntesis, degradación y/o cambios estructurales del receptor que influencien su capacidad ligadora. Otros trabajos demostraron que el molibdato ($MoO_4^=$) aumenta la capacidad de unión específica para glucocorticoides y progesterona y recientemente han sido descriptos resultados similares para receptores de E_2 en cáncer de mama. En este trabajo mostramos el efecto de $MoO_4^=$ sobre los sitios de unión

específicos para E_2 en citosol de úteros de ratas Wistar adultas, controles y castradas. Una vez extraídos los úteros, se homogeneizaron en buffer Tris 10 mM, EDTA 1.5 mM, mercaptoetanol 2 mM con el agregado o no de $MoO_4^=$ 20 mM y se separó la fracción citosólica por centrifugación o 105 000/g durante 60 minutos. El citosol fue incubado a 25° C en presencia de ^{3}H-E_2 con o sin dietilstilbestrol (DES) no radioactivo 1000 veces en exceso. La fracción libre fue separada de la unida por tratamiento con carbón dextrán y los resultados fueron expresados como picomoles/mg de ADN. Se comprobó que el tiempo óptimo de incubación a 25° C es de 1 hora y bajo estas condiciones se obtuvo completo intercambio de los receptores ocupados cuando se midieron en ratas enteras (no castradas). Por estudio de saturación y análisis de Scatchard comprobamos la presencia de 2 tipos de unión para E_2, uno de alta afinidad (K_d = 10^{-10} M) y baja capacidad (1 pm/mg ADN) y el otro de menor afinidad K_d = 2.5 x 10^{-9} M) y mayor capacidad (1.3 pm/mg ADN). Cuando se compararon los sitios de unión en ratas castradas y controles, se vio que luego de 2 meses de castración los sitios citosólicos totales determinados con 40 nM de ^{3}H-E_2 disminuyeron de 1.03 $\pm$ 0.15 pm/mg ADN en controles a 0.45 $\pm$ 0.28 pm/mg ADN en castradas ($p < 0.02$), no variando sustancialmente las constantes de afinidad de ambos tipos de unión. Sin embargo cuando se incubaron los citosoles en presencia de $MoO_4^=$, se observaron aumentos significativos en las concentraciones de receptores totales en ambos grupos de ratas: 1.62 $\pm$ 0.33 pm/mg ADN controles ($p < 0.05$) y 1.06 $\pm$ 0.35 pm/mg ADN castradas ($p < 0.02$) lo que representa un incremento del 57 % para controles y 134 % para castradas. Estos aumentos significativamente diferentes entre sí indican una mayor respuesta al $MoO_4^=$ por parte de los receptores de animales castrados. El $MoO_4^=$ preserva la integridad de los receptores inhibiendo la acción de las fosfatasas y/o proteasas. Nuestros resultados sugieren que la disminución de los sitios totales por efecto de la castración no se deberían a degradación, sino a inactivación o enmascaramiento, haciéndose evidentes en presencia de $MoO_4^=$. Nos interesa investigar si durante la castración se hallan aumentadas las actividades de enzimas que actuarían luego de romper la estructura celular por homogeneización, no pudiéndose prevenir su acción mediante las técnicas tradicionales de medición de receptores y sí cuando se utiliza $MoO_4^=$.

14

Efectos de la bromocriptina sobre la unión del estradiol en citosol de la pituitaria anterior

A. F. De Nicola, Liliana Weisenberg, M. Cristina Arakelian, C. Libertun

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Trabajos previos (*Endocrinology* 105: 1152, 1979) de nuestro laboratorio demostraron la reducción de la unión del ^{3}H-estradiol en citosol de pituitaria anterior (PA) de ratas con lesión electrolítica del hipotálamo mediobasal. Esto sugirió que el hipotálamo podría controlar los receptores de la PA ya sea por un efecto trófico directo o bien por regulación de los niveles de hormonas pituitarias circulantes (prolactina). En esta serie de experiencias, tratamos a ratas ovariectomizadas (OVX) controles, ratas con lesión de eminencia media y ratas con PA transplantadas debajo de la cápsula renal, con 3 mg/kg de bromocriptina por día durante 8 días. La PA de estos animales y los transplantes fueron extraídos, homogeneizados en buffer Tris 10 mM, EDTA 1.5 mM, mercaptoetanol 2 mM y el citosol se preparó por centrifugación a 105 000 g durante 60 min. Alícuotas del citosol se incubaron con 10 nM de ^{3}H-estradiol durante 20 min a 30° C; incubaciones paralelas se realizaron conteniendo 1000 x estradiol no-radioactivo. Las fracciones libre y unida al receptor se separaron por minicolumnas de Sephadex LH-20. Los resultados se expresan como fmoles estradiol unido/mg proteína. Prolactina sérica se determinó por RIA con los reactivos provistos por NIAMDD. Las PA de ratas controles OVX unieron 163 $\pm$ 16 fmoles/mg prot.

de ^{3}H-estradiol; una disminución del 50 % se obtuvo en las PA de ratas lesionadas en el hipotálamo ($p < 0.001$), en total acuerdo con resultados anteriores. Luego de la administración de bromocriptina la unión aumentó en las ratas lesionadas a niveles ligeramente superiores a las de los controles (p: NS), aunque los resultados fueron altamente significativos con respecto a las PA de ratas lesionadas sin tratamiento ($p < 0.02$). En una nueva serie de experimentos, bromocriptina no modificó la unión del estradiol en PA de ratas normales OVX, ni tampoco los bajos niveles de prolactina existentes en ratas OVX. En cambio, bromocriptina disminuyó los altos niveles de prolactina de las ratas lesionadas, al tiempo que restituyó la unión del estradiol. En PA transplantadas, la unión del ^{3}H-estradiol fue solamente del 10 % del presentado por PA in situ de los mismos animales (157 ± 9 fmoles/mg prot.) o de ratas normales sin transplante. La reducción de la unión en las PA transplantadas no fue prevenida por tratamiento con bromocriptina, aunque la prolactinemia de los transplantes, que se elevó cinco veces con respecto al de ratas OVX controles, fue significativamente disminuida ($p < 0.001$). Estos resultados sugieren que los cambios debidos a la lesión de eminencia media son reversibles y que la bromocriptina es capaz de actuar como terapia supletoria que normaliza la unión del estradiol de glándulas cuyos receptores fueron disminuidos por efectos de la lesión. Los altos niveles de prolactina de las ratas con PA transplantada no serían los factores responsables de los profundos cambios observados en la unión del estradiol.

15

La placenta como órgano blanco de los glucocorticoides: determinación de receptores y su regulación

CLAUDIA HELLER, H. COIRINI, A. F. DE NICOLA

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Nuestro laboratorio describió la presencia de moléculas ligadoras de glucocorticoides en placenta de rata (*Endocrinology* 108: 1697, 1981). Sin embargo, en estos estudios preliminares se determinaron receptores en animales intactos y no se descartó la ocupación parcial de los sitios por los corticoides endógenos. En la presente investigación desarrollamos un método de intercambio para determinar sitios totales en citosol. Placentas de ratas en los días 18-22 de preñez fueron separadas en dos partes: zona laberíntica (ZL) y trofoblasto basal (TB). El tejido se homogeneizó en buffer Tris 10 mM, EDTA 1.5 mM, mercaptoetanol 2 mM, glicerol 10 % y molibdato de sodio 20 mM. Luego de centrifugar a 105 000 g durante 60 min, el citosol fue incubado con 40 nM ^{3}H-dexametasona en presencia o ausencia de un exceso de esteroide no-radioactivo, a 20° C. Las fracciones unida y libre se separaron con carbón-dextrán y los resultados expresaron como fmoles unidos/mg proteína. La unión de ^{3}H-dexametasona presentó las siguientes características: *a*) máximo de unión a los 180 min de incubación en presencia de molibdato; en ausencia del mismo la unión estuvo disminuida y mostró un precoz decaimiento; *b*) análisis de saturación con ambas zonas placentarias mostró uniones de baja capacidad (Nmax 250 para TB y 190 para ZL) y alta afinidad (10^{-8}M); *c*) estudios de competición en TB revelaron efectiva competencia por 0.4, 1 y 4 μM dex. mientras que corticosterona compitió únicamente a 4 μM y no desplazaron testosterona, progesterona y estradiol; en ZA dexametasona nuevamente fue el competidor más potente, mientras que corticosterona, progesterona y testosterona compitieron débilmente a 1 μM y los dos primeros desplazaron 20-40 % a 4 μM; *d*) el intercambio conseguido entre 6 nM corticosterona agregada durante una preincubación del citosol (doble de la concentración sérica de corticosterona libre) y ^{3}H-dexametasona agregada durante la incubación fue del 90-100 % en ambas ZL y TB; *e*) finalmente, se realizaron estudios sobre el efecto del tratamiento in vivo con varios esteroides sobre la unión específica de ^{3}H-dexametasona. Se administraron durante 4 días los siguientes compuestos: 1) dexametasona 10 μg/ml

en el agua de bebida (con interrupción 24 h antes del experimento para prevenir la ocupación de los sitios por la hormona endógena); 2) corticosterona (80-100 μg/ml en el agua de bebida); 3) estradiol 50 μg/día sc; 4) progesterona 5 mg/día sc, o 5) testosterona 1 mg/día sc. Unicamente el tratamiento con dexametasona disminuyó significativamente ($p < 0.05$, test de Newman-Keuls) la unión de ^{3}H-dexametasona por TB y ZL. Estos resultados sugieren que la dexametasona regula su propio receptor en la placenta. La especificidad del efecto es sugerida porque los progestacionales, andrógenos y estrógenos no modularon la unión de dexametasona. La inefectividad de corticosterona podría deberse a su captura plasmática por los elevados niveles de transcortina de la preñez. No se justifican mayores conclusiones fisiológicas sobre estas evidencias de down-regulation hasta que el papel biológico de los receptores placentarios de glucocorticoides haya sido dilucidado.

16

Distribución regional, especificidad y regulación del receptor de aldosterona en sistema nervioso central

H. Coirini, Liliana Weisenberg, A. White, Elisa T. Marusic, A. F. De Nicola

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires y Departamento de Fisiología y Biofísica, Universidad de Chile

El sistema nervioso central (SNC) contiene receptores para las diversas clases de hormonas esteroides. Para estudiar la unión específica de aldosterona y su regulación, utilizamos ratas ovariectomizadas-adrenalectomizadas. Luego de perfundirlas por vía intracardíaca con 0.9 % NaCl, los cerebros fueron extraídos y las zonas a estudiar homogeneizadas en buffer Tris 10 mM, EDTA 1.5 mM, mercaptoetanol 2 mM y glicerol 10 %. El citosol fue incubado a 0-4° C durante 20 h (equilibrio) con ^{3}H-aldosterona ± exceso de aldosterona no-radiactiva. Las fracciones libre y unida se separaron por gel filtración en Sephadex LH-20 y los resultados se expresaron como fmoles unidos/mg proteína. La distribución regional de los receptores fue la siguiente: hipocampo >> amígdala > pituitaria anterior = septum = cerebelo = área preóptica > corteza = hipotálamo, que es relativamente semejante a la obtenida con ^{3}H-corticosterona pero diferente a la demostrada por el R-5020 (aunque la progesterona compite con los receptores de aldosterona). La unión de ^{3}H-aldosterona fue desplazada por co-incubación con aldosterona, corticosterona, dexametasona, progesterona y espirolactona. La espirolactona fue muy poco específica ya que en concentraciones de 10^{-4} a 10^{-10} M desplazó en forma similar la unión de ^{3}H-aldosterona, ^{3}H-dexametasona o ^{3}H-corticosterona incubadas separadamente con citosol de hipocampo. Por estudios de saturación y análisis de Scatchard, evidenciamos sitios de alta afinidad (10^{-9} M) y baja capacidad (40-70 fmoles/mg prot.) en citosol de hipocampo. Los sitios de unión varían en respuesta a la presencia del ligando. Cuando ratas fueron pretratadas con una dosis única de 10 μg de aldosterona 20 h antes del experimento, la unión de ^{3}H-aldosterona en citosol de hipocampo fue sustancialmente mayor que la de no-tratados. Por el contrario, la elevación crónica del nivel de aldosterona tiene un efecto opuesto. Al someter ratas intactas a dieta rica en K (3 % KCl en el agua de bebida) durante 8 días se obtuvo hiperaldosteronemia: controles 0.2 ± 0.09 ng aldosterona/ml suero (RIA), tratados con K 1.6 ± 0.3 ng/ml ($p < 0.01$). Al noveno día los animales fueron adrenalectomizados y a las 24 h se determinó la unión de ^{3}H-aldosterona en citosol de hipocampo. No existió cambio marcado de la afinidad pero el N_{max} se redujo en 50 % en los animales tratados con K, lo que sugería que la hiperaldosteronemia disminuyó el número de receptores (*down regulation*). Aunque las implicancias fisiológicas de estos experimentos no es todavía clara, prueban que existen proteínas ligadoras de mineralocorticoides en el cerebro que se regulan por el ligando. La aldosterona tendría acceso preferencial a estos receptores debido a su débil unión a las proteínas plasmáticas. La unión de aldosterona en SNC puede ser importante para explicar las acciones extrarrenales de la hormona, como ser retroalimentación negativa, regu-

lación de fluidos y electrolitos en cerebro y control central de la ingesta de sodio.

17

Regulación de sitios de unión de prolactina en membranas de estructuras nerviosas y riñón de sapos con hidratación normal y deshidratados

Isabel A. Lüthy, E. T. Segura, Viviana Lüthy, E. H. Charreau, R. S. Calandra

Laboratorio de Esteroides y Laboratorio de Fisiología del Comportamiento, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Es un hecho generalmente aceptado que la prolactina juega un papel importante en la osmorregulación y la conducta apetitiva y migratoria por el agua en los anfibios. En el presente trabajo se trató de investigar si modificaciones drásticas en la hidratación de sapos machos, *Bufo arenarum* Hensel, normales, inducían cambios en la unión de la prolactina ovina iodada (Prl-o-^{125}I) a estructuras nerviosas centrales y riñón. Con ese objeto se comparó el número de sitios de unión (expresados en fmoles/mg proteína $\pm$ ES) de animales mantenidos en agua (H) vs deshidratados (D) hasta el 70 % de su peso corporal basal. Los animales fueron sacrificados por decapitación, separándose las siguientes zonas del encéfalo: bulbo olfatorio (BO), hemisferios cerebrales (Hem), mesencéfalo: dorsal (MD) y ventral (MV) y además riñón (R) e hígado. La deshidratación produjo en BO y Hem una significativa disminución de los sitios totales (ST, medidos por desaturación in vitro con Cl_2Mg 4M): BO, H: 29.89 $\pm$ 0.879; D: 25.56 $\pm$ 0.465, $p < 0.001$; Hem, H: 54.18 $\pm$ 0.990; D: 49.19 $\pm$ 2.174, $p < 0.05$ y un significativo aumento de los sitios libres (SL): BO, H: 18.27 $\pm$ 0.252; D: 25.73 $\pm$ 0.878, $p < 0.001$; Hem, H: 28.42 $\pm$ 0.811; D: 40.91 $\pm$ 0.675, $p < 0.001$. En R y MD la deshidratación originó un aumento significativo de los ST (R, H: 61.3 $\pm$ 2.63; D: 74.36 $\pm$ 1.34, $p < 0.0005$; MD, H: 13.93 $\pm$ 0.775; D: 22.77 $\pm$ 0.381, $p < 0.001$, sin modificaciones de los SL (R, 42.7 $\pm$ 0.696; MD, 12.07 $\pm$ 0.606). No se observaron cambios tampoco en el MV (ST, 24.7 $\pm$ 1.03; SL, 18.5 $\pm$ 0.768). La constante de afinidad calculada permaneció inalterada en los diferentes tejidos estudiados, siendo su valor de (3.75 $\pm$ 1.05) $\times 10^9$ M^{-1}. Por otra parte, el tejido hepático no evidenció capacidad de unir Prl-o-^{125}I. De los resultados obtenidos y de la ya mencionada participación de la prolactina en el control del metabolismo del agua, podría inferirse que el aumento de los ST observado en R y MD de animales D, estaría vinculado a una interacción de las mencionadas estructuras en la regulación del balance acuoso. Respecto del comportamiento opuesto de BO y Hem cabría preguntarse si no estarían indicando otro tipo de modulación hormonal de estructuras nerviosas directamente involucradas en la conducta apetitiva por el agua (Hem) y la detección de fuentes disponibles de la misma (BO).

18

Acción de andrógenos y antiandrógenos en la translocación del receptor androgénico en el epidídimo de la rata

J. G. Tezón, Mónica H. Vázquez, J. A. Blaquier

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

El mecanismo por el cual las hormonas esteroides producen sus efectos específicos es mediado por la translocación del complejo receptor-hormona citoplasmático al interior del núcleo. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar cuantitativamente el efecto de la administración de diferentes dosis de andrógenos sobre la translocación del receptor citoplasmático y, paralelamente, observar el efecto de antiandrógenos sobre este fenómeno. Para esto fue necesario desarrollar un método que permitiera la medición de sitios receptores en presencia de hormona endógena, optando por un sistema de intercambio de la hormona por el ligando radiactivo trimetiltrienolona (R 1881). Se encontró que las condiciones óptimas de intercambio para el receptor citoplasmático fueron 16 h de incubación a 15° C, mientras que para el extracto nuclear (0.6 M KCl) la temperatura óptima fue 10° C. En ambos casos se obtuvo saturación

de los sitios con R 1881 12 nM. La especificidad de esta unión fue estudiada por experimentos de competición encontrándose que el R 1881 sólo fue desplazado por andrógenos de alta actividad biológica y por potentes antiandrógenos. Ratas castradas durante 48 h fueron inyectadas con 5α - DHT (0.15, 1.5, 15, 150, 500 y 1000 μg) y sacrificadas 90 min más tarde. El número de sitios citoplasmáticos disminuyó 30 % luego de la inyección de la dosis menor (0.15 μg) y este porcentaje aumentó con la dosis hasta llegar a un máximo de 70 % de disminución luego de inyectar 15 μg. Un 30 % de los sitios permaneció en el citoplasma aún después de la inyección de la dosis más alta (1 mg). Como contrapartida a esta disminución, se observó un aumento en el número de sitios nucleares. La inyección de 0.15 μg de 5α - DHT provocó un aumento de 90 % y la translocación máxima se obtuvo con la inyección de 15 μg, con un aumento del 150 %. La constante de disociación, Kd, fue calculada en 1.5 nM para los sitios citoplasmáticos translocables y 0.7 nM para los sitios residuales. Para el receptor nuclear Kd fue calculada en 2.5 nM. Los antiandrógenos acetato de ciproterona y RU 23908 fueron administrados a distintas dosis (0.15, 1.5 y 15 mg) solos y en combinación con 15 μg de 5α - DHT. Ni aun a la máxima dosis empleada los antiandrógenos fueron capaces de inducir la translocación del receptor citoplasmático al núcleo. La administración conjunta con 5α - DHT bloqueó efectivamente el efecto de translocación producido por el andrógeno. El bloqueo llegó a ser total cuando el antiandrógeno fue administrado a una dosis 1000 veces mayor que el andrógeno. Los resultados sugieren la existencia de dos poblaciones distintas de receptores en el citoplasma del epidídimo y además indican que los antiandrógenos ejercen su efecto mediante la formación de complejos inactivos con el receptor, incapaces de sufrir el proceso de activación y translocación al núcleo.

19

Relaciones entre concentración nuclear de dihidrotestosterona, niveles de receptor y crecimiento prostático

María Ana de Larminat, P. S. Rennie, N. Bruchovsky

Cancer Control Agency of British Columbia, Vancouver, B. C. Canada

La próstata en proceso de regeneración provee un buen modelo experimental para estudiar el efecto de los andrógenos sobre proliferación y diferenciación de una célula blanco. Los efectos de la administración de diferentes dosis de dihidrotestosterona (DHT) sobre proliferación celular y actividad de la 5α - reductasa, se correlacionaron con la concentración intranuclear de DHT (medida por radioinmunoensayo), y la de receptor nuclear para andrógenos (determinada por intercambio de la hormona endógena unida con el esteroide sintético ^{3}H-R 1881), en orden de determinar vínculos entre alguno de estos parámetros y respuestas celulares específicas. En próstatas de ratas castradas de 7 días, y tratadas con DHT durante 4 días, la concentración nuclear de este esteroide aumentó linealmente (r = 1.00) con la dosis inyectada (de 70 a 800 nM) para dosis de 20 a 400 μg DHT/día % g peso. Mientras tanto, la concentración extranuclear permanecía relativamente constante (70-130 nM). Mediciones de sitios receptores nucleares mostraron que bajo estas condiciones, tenía lugar una reinducción dosis dependiente. Lo mismo ocurría con la actividad in vitro de la 5α - reductasa, estando los niveles de ambos parámetros relacionados linealmente entre sí (r = 0.98). Por otra parte, el número de sitios receptores era proporcional al logaritmo de la concentración de DHT incorporada a los núcleos celulares (r = 0.92). Pequeñas dosis de DHT (20-40 μg/100 g de peso) eran capaces de estimular activamente la proliferación celular del órgano de ratas castradas en sólo 4 días de tratamiento. A dosis mayores (100-400 μg), la curva de fracción de crecimiento (GF) versus dosis se hacía más horizontal. Se verificó una relación lineal entre niveles nucleares de receptor y GF (r = 0.96). Los resultados implican: 1º Que el total de DHT acumulada en el núcleo prostático *no* es consecuencia directa de un transporte del an-

drógeno mediado por receptores. 2º Que la incorporación de células en el proceso de replicación parece ser más sensible a los niveles de *receptor* nuclear que a la concentración de *andrógeno* activo en dicho compartimiento celular. 3º Que los niveles de receptor nuclear y actividad de 5α - reductasa están directamente relacionados, en cuanto presentan el mismo tipo de curva dosis-respuesta a la terapia hormonal, coincidiendo su reinducción con actividades proliferativas, también dosis-dependientes, en el órgano estimulado.

20

Rol de la vitamina A sobre la biosíntesis esteroide - testicular

J. C. Hoschoian, Enia Comini Andrada, Estela M. L. Cardoso, D. María Coumroglón, J. A. Andrada

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El efecto que la deprivación de la vitamina A tiene sobre la reproducción ha sido largamente estudiado. Así, se ha demostrado que ratas vitamina A deficientes tienen masas testiculares notablemente menores que las normales, con cambios degenerativos del epitelio germinal y una maduración gametogénica que no sobrepasa el estado de espermátide. Aún los pasos mitóticos iniciales parecen estar afectados observándose una menor formación de espermatocitos a partir de las espermatogonias. También es notable la acción que la vitamina A tiene sobre distintas secuencias del metabolismo intermedio, habiéndose señalado su influencia sobre la síntesis de distintos tipos de RNA de células en rápida regeneración, en la glicosilación proteica y en la regulación de la actividad de un importante número de enzimas. A nivel testicular se ha demostrado que la deficiencia de la vitamina A afecta la unión aminoácida al tRNA. En la síntesis hormonal se ha señalado su acción sobre la actividad de la 2 hidroxi-esteroide dehidrogenasa testicular. Con el objeto de investigar estos hallazgos se inyectó a un lote de hamsters adultos, 60 000 UI de vitamina A de depósito en una dosis única, alimentándoselos además con pellets enriquecidos con la vitamina durante 20 días. Al finalizar dicho período se estudió la concentración de la testosterona periférica y la capacidad esteroidogénica testicular comparándose los resultados con los observados en un grupo control. Para ello, cortes glandulares fueron incubados a 35° C durante 30, 60 y 90 min., en un buffer de Krebs-Ringer-Fosfato, pH 7.4 conteniendo 100 mg de glucosa y utilizando pregnenolona-^{3}H + progesterona-^{14}C. La testosterona plasmática fue medida por radioinmunoanálisis. Los resultados obtenidos mostraron una superior concentración periférica de testosterona en los animales suplementados con la vitamina: 205 ± 20 ng/100 ml. vs 152 ± 18 ng/100 ml de los controles. El estudio glandular in vitro reveló una más activa síntesis de testosterona en los hamsters que recibieron la vitamina, comparativamente con los no tratados en cada uno de los tiempos de incubación estudiados: 30 min (12.3 vs 7.4 %), 60 min (13.5 vs 10.9 %), 90 min (16.3 vs 10.7 %). Los datos aportados revelan una activación de la vitamina A sobre la biosíntesis hormonal testicular, hecho observado tanto a nivel de la testosterona periférica como en la potencial capacidad de esteroidogénesis glandular.

21

Posible acción de la progesterona sobre la endoperóxido reductasa de útero aislado de rata ovariectomizada, suprarrenopriva y prepúber

Ana María Franchi, Elida González, Martha F. Gimeno, A. L. Gimeno

Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), CONICET, Buenos Aires

Reconocida la importancia de la $PGF_{2\alpha}$ como agente luteolítico en roedores y otras especies, y considerando que dicha prostaglandina es de origen uterino, nos interesó estudiar la influencia de la progesterona (P) en la síntesis y liberación de prostaglandinas (PGs) por el útero aislado de rata ovariectomizada (OV) de veinte días. Las ratas OV producen 4.0 ± 0.6 ng/mg ps de PG tipo F y 9.1 ± 0.4

ng/mg ps de PG tipo E. En ratas OV inyectadas con P aumentó significativamente la producción de PG tipo F (45.4 $\pm$ 4.0 ng/mg ps) mientras que la producción de PG tipo E no varió (9.2 $\pm$ 1.2 ng/mg ps). Se realizó un esdio en el tiempo, donde se observó que bastaba una hora de inyección de P (4 mg) para detectar un aumento significativo para la generación de PG tipo F (10.4 $\pm$ 1.5), no registrándose cambios en la de PG tipo E (9.5 $\pm$ 1.8). Quisimos dilucidar si este efecto de la P estaba mediado por sus receptores o no. Para ello se decidió trabajar con animales que no tuvieran dichos receptores. Es conocido que los receptores para P aparecen por la acción estrogénica, por lo tanto trabajamos con dos grupos de animales carentes de estrógenos, en el primer caso ratas OV suprarrenalectomizadas (SR), y en el segundo con ratas prepúberes de veinticinco días. En el primer caso (ratas OVSR) la síntesis de PG tipo F se encontró disminuida (2.4 $\pm$ 0.2) no siendo afectada la de PG tipo E (6.0 $\pm$ 2.4). Estas ratas fueron inyectadas con P (4 mg/día/2d) y mostraron nuevamente un aumento significativo en la síntesis de PG tipo F (20.5 $\pm$ 1.5) no modificándose la de PG tipo E (5.3 $\pm$ 0.4). El efecto estimulante de la P fue comparable en ambos grupos (OV y OVSR). Por otro lado en ratas prepúberes de veinticinco días la producción de PG tipo E fue de 3.4 $\pm$ 0.6 ng/ml y la de PG tipo F 1.3 $\pm$ 0.3 ng/ml. Estos animales fueron inyectados con 1 mg de P y sacrificados a las 6 horas de la inyección. Se vio un aumento significativo en la producción de PG tipo F (2.8 $\pm$ 0.3 ng/ml) mientras que no hubo cambios en la de PG tipo E (3.5 $\pm$ 0.5 ng/ml). De lo anterior podemos concluir que la P *per se* y en una acción no mediada por sus receptores aumenta la síntesis y liberación de PG tipo F. Además que este efecto se ejercería sobre la endoperóxido reductasa ya que en ningún caso se vio modificada la producción de prostaglandina tipo E.

22

Efectos de la pentoxifilina sobre la neurona noradrenérgica central

P. R. Lowenstein, María Irene Vacas, D. P. Cardinali

Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), Buenos Aires

Las metilxantinas pertenecen al grupo de drogas estimulantes del sistema nervioso central y a pesar de su uso difundido es escasa la información sobre su mecanismo de acción. Para estudiarlo se eligió un sistema neuronal involucrado en funciones conductuales, como es el noradrenérgico y se examinaron los efectos de la pentoxifilina (PTX) un potente derivado metilxantínico, sobre distintos indicadores neuroquímicos en el cerebro de la rata. En una primera serie de experimentos se observó que la inyección sc de 80 mg/kg de PTX produjo 3 h más tarde un aumento significativo ($p < 0.01$) en la actividad tirosina hidroxilasa (TH) cerebral, medida por la acumulación de 1-DOPA (ng/g tejido) (media $\pm$ ES,n) luego de la inyección de benserazida (un inhibidor de la descarboxilasa): control 157 $\pm$ 12 (6), PTX 389 $\pm$ 30 (6). Asimismo se observó un aumento ($p < 0.01$) en el recambio cerebral de noradrenalina (NA) determinado por los cambios en la concentración de NA (ng/g) 30-120 min después de una inyección del inhibidor de la TH α-metil-p-tirosina: *30 min:* control 335 $\pm$ 29 (6) PTX 267 $\pm$ 16 (7), *60 min:* control 306 $\pm$ 26 (7) PTX 227 $\pm$ 16 (6), *120 min:* control 284 $\pm$ 23 (7) PTX 218 $\pm$ 16 (7). Los cambios en la disponibilidad de NA fueron observados también in vitro. La incubación de sinaptosomas de hipotálamo mediobasal (HMB) de rata con 100 uM PTX indujo una mayor liberación de NA-^{3}H (pmoles remanentes en tejido/g) ante un estímulo despolarizante de 30 mM K^+: control 249 $\pm$ 24 (4), PTX 150 $\pm$ 10 (4) ($p < 0.05$). En una tercera serie de experimentos se estudiaron los cambios producidos por la misma dosis de PTX en los sitios receptores adrenérgicos α y β de áreas cerebrales, determinados por la unión específica de dihidroergocriptina-^{3}H y dihidroalprenolol-^{3}H a preparaciones crudas de membranas. Se observó una depresión significativa de sitios α (fmoles/mg prot) en la corteza cerebral: control 324 $\pm$ 43 (7), PTX 179 $\pm$ 19 (6) ($p < 0.05$) y de sitios

β en corteza cerebral, HMB y pineal: *corteza:* control 136 ± 6 (6), PTX 108 ± 10 (5) ($p < 0.05$), *HMB:* control 96 ± 4 (7), PTX 68 ± 6 (6) ($p < 0.01$), *pineal:* control 169 ± 3 (6), PTX 125 ± 5 (6) ($p < 0.05$). No se observaron cambios en la afinidad de los receptores adrenérgicos en ninguna de las regiones estudiadas. La abolición de la presinapsis pineal por gangliectomía cervical superior (Gx) eliminó los cambios postsinápticos producidos por PTX: Gx, 91 ± 8 (9); Gx, PTX 88 ± 3 (9). Luego de un tratamiento crónico con PTX (2 x 80 mg/kg durante 5 días) no se observaron los cambios en receptores-adrenérgicos detectables en el tratamiento agudo. Se interpreta que la PTX produce una estimulación de la neurona noradrenérgica central, lo que condiciona una disminución en el número de sitios receptores adrenérgicos α y β. Este efecto es mediado a través de la presipnasis, ya que su eliminación (en el caso de la glándula pineal) impide que se manifieste. El efecto sobre los receptores adrenérgicos no se observa luego de la inyección crónica de la metilxantina.

23

Influencia de agonistas y antagonistas de los receptores β adrenérgicos sobre la absorción intestinal del hierro

A. Gutnisky, E. Borda, A. L. Gimeno

Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), CONICET, Buenos Aires

Los estudios previos que realizamos in vitro sobre la absorción intestinal del Fe, empleando trozos de intestino aislado, nos sugiere que las Prostaglandinas (PGs) E_1 y E_2 tienen un efecto inhibidor sobre la absorción que se anula con Indometacina. En experimentos in vivo confirmamos esta posibilidad ya que el ácido acetilsalicílico incrementa la absorción del hierro mientras que la 15 (R)-15-Metil PGE_2 la disminuye. Dicha influencia de las PGs se observa con las de la serie E y no con la F, y como es sabido las de la serie E son las que actúan sobre la Adenilciclasa. Tratando de profundizar estos resultados y considerando al AMP cíclico un precursor intermediario de las PGs, luego que se produce la estimulación de receptores a nivel de membrana con participación de la adenilciclasa, surge que existiría una influencia sobre el comportamiento de los adrenoceptores beta y la activación de éstos a su vez podrían regular la absorción del Fe. Con esta hipótesis en mente hemos realizado experimentos in vivo con "Loops" de intestino inyectando ^{59}Fe en la luz intestinal del trozo experimental aislado y a la vez hemos usado como agonista beta al isoproterenol y como antagonista al propranolol. Pudimos así documentar los siguientes resultados: con propranolol (P) a la dosis de 2 mg/kg e isoproterenol a la dosis de 0.1 x kg los valores de incorporación del ^{59}Fe administrado fueron (Medios ± ETM) en *Sangre:* P = 1.37 % ± 0.19 y controles (C) 2.38 % ± 0.15 p = 0.001; *Bazo:* P = 0.32 % ± 0.06, C = 0.57 ± 0.03, P = 0.002; *Hígado:* p = 0.42 % ± 0.05, C = 0.66 ± 0.06, P = 0.005; *Fémur:* P = 0.99 ± 0.15, C = 1.55 % ± 0.10, P = 0.005; *Intestino:* P = 0.09 % ± 0.01, C = 0.07 ± 0.1, P = n/s. Con isoproterenol (I) en *Sangre:* I = 1.85 ± 0.11, C = 1.46 ± 0.08, P = 0.05; *Bazo:* I = 0.50 ± 0.05, C = 0.57 ± 0.3, P = n/s; *Hígado:* I = 0.88 % *Fémur:* I = 1.59 % ± 0.10, C = 1.67 ± 0.1, P = n/s; *Intestino:* I = 0.13 % ± 0.01, C = 0.13, P = n/g. Propanolol con isoproterenol juntos (P + I) *Sangre:* P + I = 2.32 ± 0.29, C = 2.17 % ± 0.22; *Bazo:* I + P = 0.38 ± 0.04, C = 0.57 ± 0.06; *Hígado:* I + P = 0.55 ± 0.05, C = 0.46 % ± 0.04; *Fémur:* I + P = 1.03 ± 0.13, C = 1.40 ± 0.15; *Intestino:* I + P = 0.07 ± 0.01, C = 0.07 ± 0.01, en ningún caso se obtuvieron diferencias significativas. Los resultados muestran una influencia inhibitoria en la absorción del Fe con propranolol, un efecto contrario con isoproterenol y una neutralización de efectos al usar las dos drogas al mismo tiempo.

24

Efectos de clonidina y diuréticos sobre la glucemia de ratones

Dora Del Baldo, J. E. Stéfano

Instituto de Investigaciones Farmacológicas (CEFAPRIN) CONICET, Buenos Aires

A dosis ligeramente superiores a las hipotensoras clonidina produce hiperglucemia en los animales de experimentación. Se cita con frecuencia que los diuréticos inducen aumento de la glucemia y glucosuria en pacientes. Este efecto hiperglucemiante no ha sido corroborado en forma experimental. El objeto de este trabajo fue analizar, en roedores, los efectos sobre la glucemia de clonidina y diuréticos por separado y en forma asociada. Se utilizaron ratones blancos, de ambos sexos con ayuno de 5 h. La glucemia se determinó en plasma de sangre venosa obtenida sin anestesiar los animales. Clonidina, subcutánea, provocó hiperglucemia dosis-dependiente que persistió hasta 3 h de la inyección. Controles 1.24 ± 0.04 g/l. Clonidina: 10 μg/kg: 1.35 ± 0.08 g/l; 30 μg/kg: 1.77 ± 0.06 g/l; 100 μg/kg: 1.75 + 0.19 g/l; 300 μg/kg: 3.61 ± 0.52 g/l; 1000 μg/kg 3.73 ± 0.33 g/l. La administración previa de yohimbina 3.5 mg/kg o fentolamina 5 mg/kg antagonizó completamente la hiperglucemia por clonidina 100 μg/kg (clonidina 1.95 ± 0.05) g/l, yohimbina 0.94 ± 0.07 g/l, fentolamina 0.97 ± 0.08 g/l; prazosin 1.14 mg/kg antagonizó sólo parcialmente la respuesta de clonidina. Los diuréticos tiazídicos: dihidroclorotiazida (dosis entre 10 y 500 mg/kg) y bendroflumetiazida (1 y 10 mg/kg) no modificaron la glucemia cuando se administraron en forma aguda ni cuando fueron inyectados diariamente durante 5 días, por distintas vías de administración (subcutánea, oral o intraperitoneal). La administración previa de los diuréticos (en forma aguda o crónica) no modificó las respuestas hiperglucémicas a clonidina. Experimentos similares se realizaron en ratas, en las cuales se midió también la diuresis. La dosis máxima de dihidroclorotiazida (500 mg/kg) que incrementó en un 60 % la diuresis tampoco modificó la glucemia. Se concluye que clonidina posee efecto hiperglucemiante mediado por receptores del tipo α_2 y que este efecto no es potenciado en roedores por diuréticos. La rata y el ratón no parecen ser modelos útiles para el análisis de los efectos de diuréticos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono.

25

La prostaglandina F_2 alfa modifica la acción de norepinefrina sobre los adrenoceptores alfa y beta de útero de rata aislado

Marcela Alicia Chaud, E. Borda, Ana María Franchi, Leonor Sterin-Borda, Martha F Gimeno, A. L. Gimeno

Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), CONICET, Buenos Aires

Dado que existe evidencia considerable de que la sensibilidad del útero a los agonistas adrenérgicos varía con el estado endocrino del mismo, como así también la síntesis de prostaglandinas (PGs), nos propusimos estudiar la existencia de correlaciones entre las PGs sintetizadas por el útero de rata durante proestro, estro y metaestro y el papel de las PGs endógenas o exógenas en la acción de las catecolaminas sobre los receptores alfa y beta adrenérgicos. Se realizaron curvas dosis respuesta (CDR) de norepinefrina e isoproterenol en útero de rata aislado; ambos agonistas adrenérgicos inhibieron las contracciones uterinas espontáneas en los tres estadíos estudiados, de los cuales, el estro fue el más sensible a la acción depresora de los agonistas y en orden decreciente, el proestro y metaestro. Los niveles de PG de tipo F liberados al medio de incubación fueron mayores en estro (5.0 ± 0.9) que en proestro (1.7 ± 0.3) o metaestro (1.5 ± 0.6) y los de tipo E más elevados en metaestro (4.1 ± 0.2) que en estro (2.4 ± 0.3) o proestro (1.9 ± 0.3) (Medias ± ETM ng/mg peso seco). La concentración de norepinefrina efectiva para un 50 % de inhibición de la actividad contráctil fue en estro 2.53 ± 1.8 (10^{-11}M), en proestro 6.00 ± 1.0 (10^{-7}M) y en metaestro 6.02 ± 1.8 (10^{-6}M); la obtenida con isoproterenol en estro fue 1.00 ± 0.3 (10^{-14}M), proestro 3.85 ± 2.1 (10^{-11}M) y metaestro 1.66 ± 0.3 (10^{-9}M). Estos valores se correlacionaron positivamente con la producción de PG de tipo E. Concentraciones subumbrales de PGF_2 alfa (10^{-10}M) desplazaron en metaestro la CDR de norepinefrina hacia la izquierda. Las CDR de norepi-

nefrina efectuadas en estro luego del bloqueo de los receptores beta adrenérgicos con propranolol, sufrieron un desplazamiento hacia la izquierda cuando el útero fue tratado con indometacina y propranolol, y hacia la derecha cuando éstas fueron realizadas además, en presencia de una dosis subumbral de PGF_2 alfa. Trabajos anteriores realizados en este laboratorio mostraron que el miometrio bajo influencia estrogénica posee una motilidad pobre, y por otro lado que la actividad contráctil del útero de rata está relacionado con su capacidad de producción de PG de tipo E. Sugerimos entonces que la influencia depresora de los estrógenos sobre la motilidad uterina se debería a: un incremento en la reactividad beta adrenérgica, una estimulación de la síntesis de PGF_2 alfa, la cual potencia la actividad beta adrenérgica y disminuye la alfa y a una influencia inhibitoria en la síntesis de PG de tipo E, la cual controla la actividad uterina espontánea.

26

Mecanismo colinérgico en la liberación de prostaglandinas por el conducto deferente aislado de rata

H. Peredo, E. Borda, María del Carmen Agostini, Martha F. Gimeno, A. L. Gimeno

Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), CONICET, Buenos Aires

Se estudió la liberación de prostaglandinas (PGs) al medio de incubación por la porción epididimaria del conducto deferente aislado de rata. El dosaje de prostaglandinas se llevó a cabo mediante el método de bioensayo y los valores se expresaron en ng/mg^{-1} de peso seco de tejido. Pudimos observar que la porción epididimaria del conducto deferente aislado de rata libera PGs tipo F (2.0 ± 0.6, $n = 6$) y E (1.9 ± 0.3, $n = 5$). Cuando el tejido fue preincubado con acetilcolina (en la concentración de 10^{-5}M observamos que tanto las PGs tipo F (11.4 ± 0.6, $n = 8$) y E (11.6 ± 2.2, $n = 7$) aumentaron significativamente. Al preincubar con atropina (10^{-5}M) por 30 minutos previos a la adición de acetilcolina, el bloqueante de los receptores muscarínicos inhibió la influencia estimulante del agonista colinérgico sobre la liberación de PGs tipo F (3.5 ± 0.8, $n = 7$) y E (2.6 ± 0.7, $n = 7$) en la porción epididimaria del conducto deferente aislado de rata. A su vez, la inhibición de la fosfolipasa A_2 con corticosterona y mepacrina, ejerció un efecto bloqueante sobre la acción estimulante de acetilcolina en la síntesis de PGs Como la literatura señala una estrecha relación entre los efectos de acetilcolina y GMP cíclico, creímos conveniente estudiar la influencia de dicho nucleótido ejercería sobre la síntesis y liberación de PGs. Pudimos observar así que, el GMPc incrementó la liberación de ambos tipos de PGs ($F = 7.4 \pm 0.8$, $n = 4$; $E = 14.5 \pm 1.2$, $n = 4$). Con respecto a los otros nucleótidos (AMP y AMPc) no afectaron dicha liberación; mientras que el ATP y el ADP no modificaron los valores liberados de PGs tipo E (2.4 ± 0.7, $n = 4$) y aumentaron los correspondientes al tipo F (10.6 ± 1.6, $n = 4$). Por otro lado, el bloqueo de la corriente lenta del calcio por el verapamil (10^{-6}M), inhibió significativamente la influencia estimulante de acetilcolina sobre la liberación de ambos tipos de PGs ($F = 4.3 \pm 1.3$, $n = 5$ y $E = 1.1 \pm 0.5$, $n = 5$). Los resultados sugieren que: 1) el conducto deferente aislado de rata tiene la capacidad de liberar PGs tipo F y E al medio de incubación; 2) que dicha liberación es estimulada por acetilcolina; 3) ese efecto sería mediado por el receptor muscarínico, ya que la atropina lo inhibió, y 4) la acción estimulante de acetilcolina sobre la síntesis de PGs por la porción epididimaria del conducto deferente aislado de rata, estaría relacionada con un aumento del GMPc; a la vez, que estimularía la entrada de calcio, activando a la fosfolipasa A_2 para la disponibilidad del sustrato precursor de PGs.

27

Respuestas cardiovasculares a drogas que actúan en neuronas serotoninérgicas de ratas anestesiadas y conscientes

S. M. CEDUCH, M. LISI, A. J. RAMÍREZ, M. A. ENERO

Instituto de Investigaciones Farmacológicas y Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

En ratas anestesiadas con uretano, el precursor serotoninérgico 5-hidroxitriptofano (5-HTP) y el agente liberador de serotonina fenfluramina, disminuyeron la presión arterial en forma sostenida. Estos resultados, sumados a otras evidencias experimentales, llevaron a postular que en el Sistema Nervioso Central la serotonina tendría un efecto hipotensor, con una probable participación de las vías serotoninérgicas bulbo-espinales descendentes (Ramírez y Enero, *Acta Physiol Lat* 29: 101, 1979; 30: 42, 1980). La anestesia es un factor que puede modificar las respuestas cardiovasculares a algunas drogas de acción central (Gomes y col, *N S Arch Pharm* 294: 141, 1976; Persson y Henning, *J Pharm Pharmacol* 32: 417, 1980). Por lo tanto, resultó de interés investigar los efectos del 5-HTP y de la fenfluramina sobre la presión arterial de ratas conscientes. La presión arterial se registró a través de un catéter insertado en una de las arterias carótidas y las drogas se administraron por la vena femoral. En los animales conscientes la presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardíaca fueron de 97.6 ± 2.3 mmHg y 335 ± 22 lat/min respectivamente ($n = 4$). Luego de administrar 5-HTP (10 mg/kg, iv), la presión arterial aumentó gradualmente hasta 117.3 ± 4.7 mmHg a los 20-30 min ($p < 0.025$ con respecto a la PAM basal). La frecuencia cardíaca no se modificó significativamente. El 5-HTP conservó su efecto presor en ratas pretratadas con MK 486 (100 mg/kg ip), un inhibidor de la descarboxilasa periférica, indicando que la acción presora del 5-HTP no dependería de su transformación a serotonina en tejidos periféricos. Por otra parte, el agente liberador de serotonina, fenfluramina (10 mg/kg, iv) tuvo un marcado efecto hipotensor seguido de una fase de hipertensión. La PAM previa a la droga fue de 113.1 ± 3.9 mmHg, disminuyendo en 61.1 ± 6.2 mmHg a los 10 seg de la inyección. Posteriormente se registró un aumento de la presión arterial y a los 20-30 seg la PAM superó a los valores basales en 21.7 ± 4.9 mmHg. La presión arterial se normalizó aproximadamente a los 60 seg ($n = 8$). La fase de hipotensión se acompañó de una marcada bradicardia. La hipotensión producida por 5 mg/kg de fenfluramina fue antagonizada por fluoxetine (5 mg/kg iv), un inhibidor específico de la captación de serotonina y que también previene la captación de fenfluramina al terminal nervioso serotoninérrgico. El bloqueante serotoninérgico metiotepine 5 mg/kg (iv) antagonizó la hipotensión producida por fenfluramina pero el grado de inhibición dependió de la magnitud de la respuesta control inducida por el agente liberador de serotonina. Estos resultados difieren de los obtenidos previamente en ratas anestesiadas, en quienes 5 mg/kg de 5-HTP o de fenfluramina producían una hipotensión sostenida y 10 mg/kg de fenfluramina era una dosis letal. El lento aumento de la presión arterial después de 5-HTP en las ratas conscientes, así como la reversión casi inmediata de la hipotensión inducida por fenfluramina podrían ser consecuencia de una acción presora de la serotonina, mientras que su efecto hipotensor se expresaría durante la anestesia, sugiriendo la participación de vías nerviosas serotoninérgicas ascendentes en la modulación de la presión arterial.

28

La actividad enzimática similar a la renina en la pared arterial. Efecto de distintas condiciones fisiológicas y patológicas

DIANA GRINSPON, ELSA MANGIARUA, NIDIA BASSO

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Estudios realizados por nosotros y por otros autores revelaron la existencia de una actividad enzimática similar a la re-

nina (ASR) en la pared vascular de ratas, cerdos y perros. En un trabajo anterior observamos que en la rata la nefrectomía bilateral produce una disminución muy importante de la ASR en la pared arterial sugiriendo que una gran proporción de la enzima es de origen renal y llega a la pared vascular a través de la circulación. Podría haber un paralelismo entre la ASR vascular y la actividad renínica plasmática (ARP). Sin embargo otros estudios sugieren que esta relación no se cumpliría en todos los casos en que se modifica la ARP produciéndose una disociación entre ambos parámetros. El presente estudio se realizó con el fin de evaluar los cambios en la ASR vascular en distintas condiciones experimentales que determinan modificaciones de la ARP y comparar las variaciones de ambos parámetros. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar que se dividieron en cinco grupos: 1) Controles intactos (C); 2) Dieta hiposódica (Ho); se los mantuvo 10 semanas con una dieta de 1.4 mEq de sodio/kg y H_2O D para beber; 3) Dieta hipersódica (Her) se los mantuvo durante 10 semanas con una dieta de 140 mEq sodio/kg y solución fisiológica para beber; 4) $DOCA_{30}$-sal (Ht $DOCA_{30}$) recibieron 50 mg/kg de cortexón depot sc 2 veces por semana durante 4 semanas y solución fisiológica para beber; 5) $DOCA_{60}$-sal (Ht $DOCA_{60}$) el tratamiento anterior se prolongó durante 8 semanas. En todos los animales se tomaron muestras de sangre semanalmente por sección de la punta de la cola. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente se les extrajo la aorta desde el cayado hasta las arterias femorales y la arteria mesentérica con sus ramificaciones más finas. Los tejidos se lavaron con solución fisiológica (SF) fría, se pesaron y se homogeneizaron en SF con EDTA (8mM). El sobrenadante se incubó durante 3 h a pH 7.2 en presencia de sustrato semipurificado obtenido de plasma de ratas nefrectomizadas en presencia de la cantidad adecuada de los inhibidores usuales de angiotensinasas. La angiotensina I (AI) formada se valoró por radioinmunoensayo. Los resultados revelaron un aumento significativo de la ARP en las ratas Ho (+ 62 % $p < 0.05$) que va acompañada de una disminución no significativa de la ASR vascular tanto en la aorta como en la mesentérica. En cambio en los animales Her se observó una caída en la ARP (– 62.7 %, $p < 0.05$) acompañada de un cambio similar en la pared vascular tanto en la aorta (– 49.1 %) como en la mesentérica (– 43.0 %) ($p < 0.05$). Por otra parte la ARP en las ratas Ht $DOCA_{30}$ y Ht $DOCA_{60}$ se redujo en un 98.6 % mientras la ASR de la aorta cayó un 45.3 % ($p < 0.05$) a los 30 días y un 29.2 % a los 60 días siendo esta última variación no significativa; cambios similares se observaron en la mesentérica con un descenso del 56.3 % ($p < 0.05$) a los 30 días y sin modificación a los 60 días. Podemos concluir que la ASR vascular no depende exclusivamente de la ARP presentándose una disociación entre ambas variables en distintas condiciones fisiológicas y patológicas. La pared vascular sería capaz de fijar la renina circulante pero también podría sintetizar la enzima y así regular en forma diferente la concentración vascular de la misma.

29

Efectos de la salazina sobre la acción antinatriurética y vasoconstrictora renal de la indometacina en perros con sobrecarga salina aguda

M. Barrera, G. Altenberg, S. Panese, D. Priollini, E. Barrera, L. A. Barrera, N. L. Yeyati

Hospital de Clínicas Gral. José de San Martín, Servicio de Nefrología y Segunda Cátedra de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La indometacina (IMT) revierte parcialmente la natriuresis por sobrecarga salina aguda, concomitantemente con una marcada vasoconstricción renal. Dichos efectos pueden atribuirse a una inhibición de la síntesis de prostaglandinas renales y potenciación de la acción vasoconstrictora y antinatriurética de la angiotensina endógena. Con el propósito de verificar dicha hipótesis en 6 perros anestesiados y expan-

didos por infusión salina isotónica (10 % de su peso corporal) se administró IMT (5 mg/kg de peso) y posteriormente saralazina (10 μg/kg/min). La indometacina provocó una marcada reducción de la excreción urinaria de Na de 279 $\pm$ 124 a 182 $\pm$ 86 μEq/min ($-$53.1 $\pm$ 10.7 %, $p < 0.01$). La filtración glomerular evaluada por la depuración de la creatinina exógena no se modificó, el flujo plasmático renal efectivo estimado por la depuración del Hippuran marcado con ^{131}I de 93.9 $\pm$ 12.0 desciende a 66.4 $\pm$ 11.1 ml/min ($-$ 36.2 $\pm$ 5.3 %, $p < 0.001$). La fracción de filtración ascendió de 35 $\pm$ 7 a 48 $\pm$ 5 % (+ 49.7 $\pm$ 12.8 %, $p < 0.01$) y la resistencia vascular renal calculada de 1.22 $\pm$ 0.16 a 2.04 $\pm$ 0.37 (+ 74.7 $\pm$ 11.9 %, $p < 0.001$). La presión arterial media experimentó un moderado ascenso no significativo de 107 $\pm$ 3 a 119 $\pm$ 5 mmHg. La infusión de saralazina no modificó ninguno de los parámetros previamente mencionados. Se concluye que la IMT tiene un marcado efecto vasoconstrictor renal y antinatriurético en el perro anestesiado y expandido por sobrecarga salina aguda. Dichos efectos no serían mediados por una facilitación de la acción intrarrenal de la angiotensina endógena ya que no son revertidos por la saralazina. Es posible que la sobrecarga salina al expandir el volumen extracelular a la vez que inhibe la actividad del sistema renina-angiotensina estimule o facilite la acción de las prostaglandinas.

30

Cambios cardíacos durante el desarrollo de la hipertensión renal experimental

ELSA INÉS MANGIARÚA, MARÍA TERESA MÁRQUEZ, A. GALLO, C. M. TAQUINI, P. ARAMENDÍA

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La posibilidad de que los cambios estructurales, tanto cardíacos como vasculares, sean el resultado exclusivo del aumento de la presión arterial es polémica en la hipertensión arterial. Más aún, se ha afirmado que las modificaciones de la actividad mecánica del corazón eran prioritarias en el desarrollo de la enfermedad. Con el objeto de evaluar esta hipótesis se utilizaron 56 ratas Wistar, machos, cuyo peso osciló entre 320-370 g. En todos los animales se midió presión arterial hasta su decapitación y rápida extracción del corazón; la aurícula izquierda se empleó para estimar las variables de contractilidad (a 1 Hz, 5 ms, voltaje supramáximo) en condiciones basales y con curvas dosis-respuesta inotrópica a la noradrenalina (NA); los ventrículos fueron pesados y utilizados para determinar la concentración y el contenido total de ARN (reacción del orcinol), ADN (reacción de difenilamina) y proteínas (método de Lowry). Los grupos experimentales se dividieron de acuerdo con los procedimientos y plazos que se detallan: animales intactos, testigos (T), $n = 10$; ratas con implantación de un clip renal (0.22 mm) —modelo 2 riñones 1 clip—, sacrificadas a los 3 (C_3), 6 (C_6) y 21 días (C_{21}) de la isquemia renal ($n = 10$ para los dos primeros y $n = 6$ para el último); ratas sometidas a una operación simulada con determinaciones a los 3 (S_3) y 6 (S_6) días, $n = 10$ en cada caso. Los C_{21} son los que mostraron mayor elevación de la presión arterial. En todos los grupos se vio un aumento de peso del corazón referido a la superficie corporal (mg/cm^2) con respecto a T = 1.69 $\pm$ 0.02; S_3 = 1.87 $\pm$ 0.02 ($p < 0.001$); C_3 = 1.84 $\pm$ 0.05 (NS vs S_3); S_6 = 1.88 $\pm$ 0.06 ($p < 0.001$); C_6 = 1.91 $\pm$ 0.06 (NS vs S_6) y C_{21} = 2.04 $\pm$ 0.03 ($p < 0.001$). La tensión desarrollada máxima basal (T_{max}), no varió en ninguno de los grupos, como tampoco en las respuestas a la NA, cuyo pD_2 mostró una subsensibilidad únicamente en S_3 ($p < 0.01$) con respecto a T mientras no se modificó en los otros casos. El tiempo a la tensión pico (TTP), aumentó significativamente en S_6 ($p < 0.01$) y C_{21} ($p < 0.02$). Contrariamente, la velocidad de desarrollo de la fuerza (dT/dt), el tiempo de relajación (TR) y el tiempo total de la contracción (TC), no variaron en ningún grupo. Se observó un aumento en el contenido de ARN en el grupo C_{21}. La relación proteínas/ADN fue significativamente mayor en C_{21} = 1.37 $\pm$ 0.16 vs T = 0.92 $\pm$ 0.07 ($p < 0.05$). Resumen y conclusiones: 1) el cambio de la relación peso car-

díaco/superficie corporal no se relacionó con los niveles de presión arterial; 2) apenas a los 21 días del clip se observaron cambios en el contenido y concentración de proteínas miocárdicas coincidentemente con el mayor índice de la relación peso cardíaco/superficie corporal; 3) las modificaciones de las proteínas cardíacas estarían vinculadas con la presión arterial mientras que otros factores, ajenos a ésta, determinarían el aumento del tamaño cardíaco; 4) no parecen existir factores humorales que determinen un aumento precoz del estado contráctil del miocardio evaluado por las variables contráctiles auriculares.

31

Expresión fenotípica de los síndromes con hemoglobina S

Beatriz Iparraguirre de Weinstein, G. Chiappe, Silvia Destéfano

Servicio de Hematología, Hospital Francés, Buenos Aires

La hemoglobina S (Hb.S) es el resultado de la sustitución de un amonoácido, valina por ácido glutámico, en la sexta posición de la cadena de globina y en la forma deoxigenada se caracteriza por su tendencia a polimerizarse. Los eritrocitos que contienen Hb.S, sometidos a bajas tensiones de O_2 se elongan, la hemoglobina polimerizada se acumula en fibras longitudinales paralelas a un lado de la célula y la forma resultante se denomina "sickling" o drepanocito. La magnitud del "sickling" depende de la cantidad de Hb.S presente en la célula y de ésto derivan las manifestaciones clínicas de los diferentes síndromes con Hb.S: heterocigotas, homocigotas y dobles heterocigotas. La interacción con otras hemoglobinas normales o patológicas y con las diferentes formas de talasemia, también modifican su expresión fenotípica. Se estudiaron 31 pacientes con Hb.S, pertenecientes a 7 familias. Para caracterizarlos se utilizaron las siguientes técnicas: electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa con buffer Tris-EDTA Borato, pH 8.4 y con buffer fosfato pH 6.5; la identificación de Hb.S fue confirmada por pruebas de solubilidad; electroforesis en agar con buffer citrato pH 6.2; determinación de hemoglobina fetal por la técnica de desnaturalización alcalina de Betke; cuantificación de Hb.A_2 por cromatografía en DEAE-celulosa y de las otras hemoglobinas presentes por cromatografía en DEAE-Sephadex A-50; investigación de cuerpos de Heinz (CH) con azul de brillante cresilo y determinación de hierro sérico. Se identificaron 11 pacientes heterocigotas para Hb.S (A/S), 2 homocigotas para Hb.S (S/S), 1 doble heterocigota para Hb.S/beta talasemia, cinco dobles heterocigotas para Hb.S/alfa I talasemia, 1 doble heterocigota para Hb.S/enfermedad Hb.H, 1 doble heterocigota para Hb.S y Hb.D (S/D) y 1 heterocigota para Hb.D (A/B). La correlación entre la proporción de las diferentes hemoglobinas CH y manifestaciones clínicas fue la siguiente: A/S: S = 30 - 45 %, A = 65 - 70 %, F y A_2 normales y sin manifestaciones clínicas S/S: S = 90 - 95%, A ausente, F = 6 - 8 %, A_2 normal y anemia severa con crisis dolorosas óseas y abdominales; S/beta talasemia: S = 90 %, A ausente, F = 8 %, A_2 = 4 %, anemia severa con episodios trombóticos y crisis dolorosas frecuentes; S/beta talasemia: S= 65 %, A = 25 %, F = 5 %, A_2 = 5 % y anemia moderada con ocasional crisis dolorosa, S/alfatalasemia I : S entre 19-25 %, A entre 72-80 %, F normal, A_2 normal o baja, CH positivos uno cada 500-1000 eritrocitos y ligera anemia hipocrómica con ferremia normal; S/enfermedad Hb.H: S = 25 %, A = 68 %, F = 2 %, A_2 = 1.5 %, abundantes CH, severa anemia hipocrómica con ferremia normal y crisis hemolíticas precipitadas por infecciones intercurrentes y drogas oxidantes; S/D: S = 43 %, D = 55 %, F y A_2 normales, anemia moderada, sin crisis dolorosas ni trombosis.

32

Capacidad de recuperación de embriones con deformaciones agudas por la aplicación de fuerzas de hasta 10 000 G. durante la neurulación

J. Herkovits, L. Colombo

Instituto de Biología de la Reproducción y Desarrollo Embrionario, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Provincia de Buenos Aires

En estudios previos se evaluó la capacidad de regulación de la forma de embriones de *Bufo arenarum* estableciéndose que a partir del estadío de néurula pueden no sólo mantener sino regular su forma, lo que permite a embriones que desarrollan aún con deformaciones experimentales muy graves, recuperar ulteriormente en forma gradual una morfología normal. Estudios de microscopía óptica y electrónica nos permitieron comprobar que dichas alteraciones se manifestaban a nivel celular como deformaciones celulares, permaneciendo las uniones inter-celulares generalmente normales de tal manera que la capacidad de recuperación se debería a que las células, conforme progresa el desarrollo, adoptarían la forma que les correspondería en cada estadío independientemente de las formas que tuvieron en estadíos previos (para una revisión y análisis teórico, ver *Acta Biotheor* 27: 185, 1978). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de cambios agudos en la forma del embrión producidos por fuerzas físicas G. sobre su desarrollo ulterior y conocer el límite de resistencia a dicha fuerza durante el estadío de néurula. Se utilizaron embriones de *Bufo arenarum* en estadío de néurula que se centrifugaron a 5000, 7000 y 10 000 G durante 5 a 10 min en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B. En estas condiciones los embriones se aplanaron de tal manera que a partir de la forma esferoide inicial pasaron a una forma numular. No se verificaron deformaciones preferenciales, observándose en cada una de las "caras de la moneda", la parte cefálica, dorsal, lateral, etc., indistintamente. Las observaciones con microscopio estereoscópico permitieron comprobar que si bien en general los embriones no presentan zonas con solución de continuidad en su epitelio, dicha lesión aparece con mayor frecuencia cuanto más fuerte y prolongada es la fuerza aplicada, de tal manera que podemos considerar como límite de resistencia para este estadío, el de 10 000 G, durante 10 minutos, ya que tras esa condición se puede observar no sólo solución de continuidad en el tejido ectodérmico sino la ruptura misma del embrión. Los cortes histológicos de embriones experimentales viables permitieron comprobar un corrimiento de los gránulos de pigmento en la dirección y sentido de la fuerza aplicada sin que se pudiera verificar, salvo la deformación misma, otras alteraciones. Tras ser centrifugados los embriones se mantuvieron en solución fisiológica comprobándose que recuperan gradualmente una morfología normal y continúan su desarrollo al igual que los controles. Aquellos embriones que presentaron una grave solución de continuidad en su ectodermo pudieron continuar con su desarrollo pero se recuperaron sólo parcialmente debido a que se produce una contracción de los tejidos e incurvación del embrión hacia el lado lesionado. Los resultados presentados nos permiten concluir que: 1) el embrión en estadío de néurula es resistente a la aplicación de fuerzas de hasta 10 000 G, por 5 minutos de tal manera que a pesar de graves alteraciones en su forma y la distribución de ciertos componentes citoplasmáticos, de los que el pigmento es un indicador y ejemplo, no se afecta la sobrevida ni el ulterior desarrollo de los mismos; 2) la capacidad de recuperación de la forma que presentan estos embriones experimentales, avala nuestros resultados e hipótesis previos sobre capacidad de regulación de la forma durante el desarrollo embrionario.

33

Población folicular y volumen folicular en ratones de alta y baja eficiencia reproductiva

María del Rosario Blanco, J. Herkovits

Instituto de Biología de la Reproducción y Desarrollo Embrionario, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Provincia de Buenos Aires

Desde el punto de vista de las gametas, la limitación en la capacidad reproductiva

en famíferos la determina la hembra, debido a que las gametas femeninas se producen cíclicamente y en escaso número. Además existen marcadas diferencias en la eficiencia reproductiva en los diferentes mamíferos y hasta en distintas cepas, lo que se debe básicamente a diferencias en el número de gametas que libera el ovario en cada caso. Para tratar de comprender estas diferencias se realizaron estudios endocrinológicos y se efectuaron recuentos de los folículos en los ovarios. Los estudios funcionales si bien han permitido obtener superovulaciones, no son suficientes para poder explicar las diferencias en la eficiencia reproductiva. Los estudios de población folicular permitieron conocer que los ovarios de aquellas especies que presentan mayor número de folículos primordiales son paradojalmente las que tienen menor eficiencia reproductiva. El objetivo de nuestro estudio fue tratar de encontrar un parámetro que permita correlacionar en forma directa y comprensible la relación entre la población folicular y la eficiencia reproductiva. A tal efecto se realizó un recuento del número de folículos (fol) en ovarios derecho e izquierdo en dos cepas de ratones; Rockland y C3H, de alta y baja eficiencia reproductiva respectivamente. Se sacrificaron hembras al azar de aproximadamente 61 días de edad en estadío de diestro y los ovarios fueron procesados de acuerdo a técnicas histológicas standard. La evaluación de los cortes se realizó midiendo el diámetro folicular, contabilizando solamente los fol, que presentaban en el corte la imagen del nucléolo; los fol se clasificaron en diez categorías, a saber: 25 a 40 μ, 41 a 80 μ, 81 a 100 μ ,101 a 130 μ. 131 a 195 μ, 196 a 260 μ, 261 a 325 μ, 326 a 390 μ, 391 a 420 μ y 421 a 570 μ. El número de fol en el ovario derecho de la cepa Rockland fue de 1104.4 fol distribuidos de acuerdo a las categorías antes mencionadas en: 816 fol, 23.2 fol, 26.2 fol, 65.6 fol, 68.4 fol, 80.4 fol, 16.4 fol, 3 fol, 3.2 fol y 8.4 fol, respectivamente. Y en la cepa C3H el número de fol fue de 1542.8 fol, distribuidos de la siguiente forma: 1256.3 fol, 108 fol, 71.8 fol, 41 fol, 28.6 fol, 18.8 fol, 2.8 fol, 2.6 fol, 4.2 fol y 11.4 fol, respectivamente. El número de fol en el ovario izquierdo en la cepa Rockland fue de 1480.83 distribuidos por categorías en: 1070 fol, 77.67 fol, 86.33 fol, 135.50 fol, 42.50 fol, 37.83 fol, 14 fol, 6.67 fol, 10.17 fol y 0.17 fol, respectivamente. Y en la cepa C3H el número de fol fue de 1441.5 fol, distribuidos por categorías en: 992 fol, 249.17 fol, 116.67 fol, 34.17 fol, 18.67 fol, 15.67 fol, 6 fol, 0.83 fol, 6.67 fol y 1.67 fol, respectivamente. Considerando a los fol como cuerpos esferoidales se ha calculado el volumen folicular de cada categoría y el volumen fol total de un ovario de cada cepa, siendo para el ovario derecho de la cepa Rockland 1.642 mm^3, y para la cepa C3H 1.183 mm^3; para el ovario izquierdo de la cepa Rockland 1.202 mm^3, y de la cepa C3H 0.692 mm^3. Para correlacionar estos resultados con el número de ovocitos liberados por cada gónada, se efectuó un recuento de cuerpos amarillos corroborando que los promedios son mayores en la cepa Rockland que en la C3H, siendo además mayores en los ovarios izquierdos de ambas cepas. De los resultados expuestos surge que el número de fol primordiales es un parámetro secundario para evaluar la eficiencia reproductiva, ya que en el ovario izquierdo de la cepa Rockland hay un mayor número de fol primordiales y es la que presenta también mayor eficiencia reproductiva. Motivo por el cual para evaluar la eficiencia reproductiva introducimos un nuevo parámetro, el volumen folicular total, ya que dicha eficiencia es proporcional al volumen que corresponde a los fol, tanto en las cepas de alta como las de baja eficiencia reproductiva.

34

Formación del intestino primitivo: estudio con microscopía electrónica de barrido

J. Herkovits, J. C. Gardón, F. Rumiano, Patricia Palermo, L. Colombo

Instituto de Biología de la Reproducción y Desarrollo Embrionario, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Provincia de Buenos Aires

La formación del intestino primitivo se inicia durante la gastrulación, prosiguiendo durante el estadío subsiguiente de néurula las interrelaciones endodermomesenquimá-

ticas específicas en cada región, lo que determina la gradual diferenciación de los distintos órganos del tracto digestivo. El objetivo del presente trabajo es describir la formación general del intestino de *Bufo arenarum* y las características de forma y superficie de las células endodérmicas en las distintas regiones, asociando las diferencias encontradas con el origen de dichas células y las interrelaciones que establecen con el mesodermo. Por otra parte se considerará la posible participación de esas células en la formación del cordomesodermo durante las etapas tempranas del desarrollo. Se utilizaron embriones de *Bufo arenarum* disecados en sentido sagital y frontal y procesado para microscopía electrónica de barrido de acuerdo con técnicas ya descriptas. Los especímenes fueron observados en el Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del CONICET. La superficie apical de las células se obtuvo utilizando la fórmula geométrica que más se adecuó en cada caso, realizando un promedio sobre no menos de diez células de cada zona. La formación del intestino primitivo se inicia mediante la invaginación de un conjunto de células superficiales constituyendo un saco aplanado que se elonga gradualmente hasta alcanzar la zona cefálica. Las células que inician este desplazamiento adoptan una forma en botella característica y están ubicadas en la zona del organizador de la gastrulación. Esas células dividen a las restantes células endodérmicas en base a su posición en supra y sub-blastoporales, siendo ambas de forma cuboide, pero las primeras mucho más pequeñas, de tal manera que su superficie apical es de 120 μ^2 mientras que en las segundas es de 590 μ^2. Durante las etapas iniciales de la invaginación se observan células en botella que parecen perder sus contactos con la superficie, entremezclándose con las células del tejido cordomesodérmico vecino. Completado el proceso de invaginación la cavidad intestinal se abre mediante un proceso morfogenético ya descripto. En la etapa de néurula persiste y se incrementa la marcada diferencia en la forma y superficie que revisten las células endodérmicas en función de la región que ocupan. Así en la parte dorsal las células endodérmicas presentan una superficie de 110 μ^2, son muy abovedadas y cabe destacar que estas células cuboideas participan mediante algunas de sus otras caras también en la formación de la notocorda. En la zona lateral se observan células aplanadas cuya superficie es de 850 μ^2, mientras que en la zona media ventral son cuboideas y revisten una superficie de 700 μ^2. También se registran diferencias entre la zona cefálica y caudal del intestino. Así en la zona céfalo-ventral las células son cilíndricas, abovedadas, entremezclándose grandes y pequeñas y tienen una superficie promedio de 180 μ^2, mientras que en la zona ventro-caudal son aplanadas con una superficie apical de 700μ^2. Los resultados presentados nos permiten concluir que: 1) las diferencias encontradas entre las células endodérmicas pertenecientes a las distintas regiones del intestino primitivo, se deberían por un lado a su origen supra o sub-blastoporal y por otro lado a la interrelación que establecen con el tejido mesodérmico vecino ya que como se sabe una de las primeras respuestas en interrelación celular puede resultar en cambios de la forma de la célula; 2) las células endodérmicas parecen participar en la formación del cordomesodermo tanto en la etapa de gástrula mediante el aporte de algunas células en botella, como durante la néurula mediante las células endodérmicas que parecen incorporarse desde el techo del intestino a la notocorda.

35

Actividades de células embrionarias diferidas experimentalmente: estudios con microscopía electrónica de barrido

MARTA PÉRSICO, J. HERKOVITS

Instituto de Biología de la Reproducción y Desarrollo Embrionario, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Provincia de Buenos Aires

Estudios previos con microscopía óptica y electrónica de barrido (MEB) nos han permitido conocer en detalle la estructura interna del embrión durante las distintas etapas de la gastrulación, así como los cambios en la forma y contactos celulares que

se verifican durante dicha etapa. Por otra parte se estudiaron con la misma metodología, los cambios de forma y contactos celulares que acontecen durante procesos de disociación y reasociación experimental de células pertenecientes a gástrula debidos a modificaciones en el contenido de calcio del medio. El objetivo del presente trabajo fue conocer qué actividades realizan, al ser reasociadas, células cuyo desarrollo fue interrumpido durante toda la gastrulación, mediante disociación celular. Se utilizaron embriones de *Bufo arenarum* que fueron mantenidos en solución de Holtfreter hasta el estadío de blástula final momento en el que fueron colocadas en una solución disociante compuesta por: EDTA 1.168 g ClNa 4.36 g ClK 0.18 g PO_4Hna_2 0.089 g PO_4H_2K 0.019 g CO_3HNa 2.13 g SO_4Na_2 0.27 g por litro de agua. Cuando los controles alcanzaron el estadío de gástrula inicial se seleccionaron aquellos embriones que estaban ya disociados. Posteriormente, al alcanzar los controles el estadío de fin de gástrula, los embriones experimentales se colocaron en una solución reasociante compuesta por: ClNa 3.5 g ClK 0.05 g Cl_2Ca 0.08 g $(NO_3)_2CaH_2O$ 0.06 g PO_4H_2Na 0.03 g PO_4H_2K 0.03 g CO_3HNa 0.02 g por litro de agua, en la que permanecieron hasta que los controles alcanzaron el estadío 18. Cumplidas las etapas de reasociación ya descriptas, se observó con MEB una notable similitud en la morfología y asociación de algunos tipos celulares con los observados en gástrula y néurula normales. En efecto, se comprobó la presencia de grupos celulares que presentaban en conjunto una forma esferoide constituidos por células piramidales cuyo vértice se orienta hacia el centro, mostrando una imagen similar a la notocorda. Se encontraron otros grupos formados por células cilíndricas dispuestas en empalizada, distribuidas en una a tres capas, semejantes a las imágenes correspondientes al ectodermo neural durante la etapa de inducción. La superficie externa de los embriones reasociados muestra células poliédricas con superficie apical abovedada y uniones apico-laterales como surcos en forma similar a los que se observan en el epitelio que recubre a una gástrula normal. Otros grupos celulares presentan formas en botella disponiéndose en abanico alrededor de un punto de invaginación tal como se observa durante la gastrulación al comienzo del proceso morfogenético que genera el intestino primitivo. Nuestros estudios nos permiten concluir que las células a pesar de no haberse mantenido en un medio no fisiológico y permanecido disociadas durante toda la gastrulación, al ser reasociadas, generan formas y se asocian de una manera similar a la que presentan en condiciones normales durante la gastrulación, es decir, retomando las actividades para las cuales estaban programadas previamente a la disociación experimental.

36

Capacidad de resistencia de embriones en etapas organogenéticas a fuerza de 30 000 G

J. Herkovits, L. Colombo

Instituto de Biología de la Reproducción y Desarrollo Embrionario, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Provincia de Buenos Aires

La aplicación de fuerzas centrífugas es un método de elección para la obtención de muestras que representen distintos componentes celulares en forma más o menos específica. Así para trabajos de biofísica y bioquímica se describieron varios métodos de fraccionamiento celular para embriones de Anfibios mediante los cuales se separan vg plaquetas vitelinas, gránulos de pigmento y núcleos a aprox 500 G, mitocondrias a aprox 12 000 G y citosol como sobrenadantes de la fracción anterior. El objetivo del presente trabajo fue conocer el efecto de la aplicación de fuerzas de hasta 30 000 G sobre organismos vivos, embriones de *Bufo arenarum* en etapas organogenéticas, evaluando: *a)* sobrevida; *b)* cambios en la forma; *c)* cambios en la distribución de elementos celulares; *d)* actividad de las células ciliadas del ectodermo, y *e)* actividad cardiovascular. Se utilizaron embriones de *Bufo arenarum* en estadíos 19-20 a los que se aplicó entre 5000 y 30 000 G durante 10 a 20 min en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B. En estos estadíos los embriones son alargados y

aplanados de tal manera que normalmente se apoyan sobre uno de sus lados. Los gránulos de pigmento se distribuyen principalmente en las células ectodérmicas en mayor concentración cerca de su borde apical. Dichos embriones presentan una actividad ciliar ectodérmica que los desplaza en forma permanente en dirección céfalo-ventral; nadan espontáneamente o por estimulación y tienen una frecuencia cardíaca de 40/min a 17° C. Al aplicárseles fuerzas desde 5000 a 30 000 G por hasta 20 min se comprobó que: 1) los embriones se achatan ostensiblemente sólo por arriba de los 20 000 G; en cambio ya a partir de 5000 G se observó la formación de ampollas subectodérmicas que se extendieron y generalizaron sobre un solo lado a medida que se incrementó la fuerza G. Tanto a 5000 como a 30 000 G se comprobó en cortes histológicos un corrimiento de los gránulos de pigmento de tal manera que en las células ectodérmicas sobre las que el embrión presumiblemente se apoyó durante la centrifugación, formaron una densa línea oscura en la zona apical mientras que en el lado contralateral se distribuyeron ocupando también zonas basales de las células. Los embriones experimentales mantenían una actividad ciliar y natatoria aparentemente normal en todas las condiciones experimentales, pero la actividad cardiovascular presentaba graves alteraciones que consistían en paro cardíaco o contracciones cardíacas muy débiles, ineficaces para mantener la circulación sanguínea. Este estado persiste en promedio por 30 min recuperando luego el corazón gradualmente una fuerza de contracción normal mientras que la frecuencia se incrementa transitoriamente a 65/mon en promedio. Los embriones que se achataron por la fuerza G se recuperaron durante su desarrollo ulterior, como así también la formación de ampollas subectodérmicas desapareció en los estadíos subsiguientes. Los resultados obtenidos permiten concluir que: 1) los embriones en etapas organogenéticas son resistentes a la aplicación de fuerzas de 30 000 G durante 20 min lo que revela un importantísimo incremento de la resistencia con respecto a estadíos anteriores; 2) dicha resistencia general al igual que la escasa repercusión sobre la forma del embrión en estos estadíos, podría deberse, al menos en parte, a la forma aplanada que presentan los embriones en estas etapas, al escaso espacio que corresponde a cavidades y probablemente a la conformación más resistente de todos los tejidos que componen el embrión; 3) los cambios en la distribución de los gránulos de pigmento son un claro indicador de alteraciones en la distribución de los componentes celulares como consecuencia de la aplicación de fuerzas G; 4) los efectos de la aplicación de 30 000 G no afectan la actividad ciliar ni la neuromuscular (natación) del embrión, pero sí la actividad cardíaca que tras detenerse o ser insuficiente se reinicia al comienzo con latidos débiles, alcanzando gradualmente una fuerza de contracción normal. El incremento transitorio en la frecuencia cardíaca probablemente está vinculado con la compensación de los efectos producidos por el paro cardiovascular.

37

Trisomía 11q y monosomía 9p transmitida por translocación (9 : 11) paterna

Mercedes Lovell, R. Coco, Cristina Zulema Barreiro

Laboratorio de Citogenética, Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Sección de Genética Clínica, Hospital de Niños, Buenos Aires

Existen en la literatura más de una decena de casos de monosomía parcial 9p, las cuales han permitido delinear un síndrome clínico caracterizado por: trigonocefalia, oblicuidad mongoloide de las aperturas palpebrales, epicantus, discreto exoftalmos, nariz pequeña con puente nasal ancho, filtrum largo, boca pequeña, micrognatia, orejas displásicas, cuello corto a veces con pterigium, hipoplasia de labios mayores en las niñas e hipospadias en el varón. El retardo mental es severo. La deleción en la mayoría de los casos es de novo, con punto de rotura en 9p22. Por el contrario, sólo cuatro casos de trisomía 11p han sido descriptos, siendo variables los segmentos involucrados: 11p11 → 11pter (Falk et al, 1973), 11p12 → 11p14 (Sánchez et al, 1974), 11p11 → 11p15 (Palmer

et al, 1976) y 11p14 → 11pter (Bajolle et al, 1978), todos transmitidos por diferentes rearreglos parentales equilibrados. Pero estos casos no han permitido delinear un cuadro clínico característico. Se describe por primera vez un niño de 14 meses de edad, que consulta por micropene y testículos pequeños, con trisomía 11p, desde 11p11 hasta 11p ter, y monosmía 9p, desde 9p12 hasta 9pter, transmitida por translocación recíproca t (9 : 11) (p12 : p11) paterna. El propósito es el producto del segundo de tres embarazos de la pareja. El primero terminó en aborto espontáneo en el segundo trimestre y el tercero fue un embarazo extrauterino. La madre tenía una niña sana de 6 años de una pareja anterior. El niño nació de embarazo a término, con movimientos fetales de menor intensidad, parto por césarea por falta de dilatación y cesárea previa, con un peso de 3 100 g. Llanto espontáneo. Al examen físico presentaba: microbraquicefalia, fontanelas cerradas, implantación del cabello posterior baja, hipertelorismo ocular con oblicuidad mongoliode de las aperturas palpebrales y epicantus bilateral, nariz pequeña de dorso recto y narinas antevertidas, hipoplasia malar, filtrum largo con hipoplasia de los pilares, micrognatia leve, orejas de implantación baja, rotadas y con el lóbulo adherido, cuello corto, micropene y testículos pequeños. Las pautas madurativas estaban retrasadas, aún no se sentaba y caminó a los 28 meses. Los exámenes cardiológico y oftalmológico fueron normales. Los dermatoglifos mostraron un desplazamiento del trirradio axial en t'-t''. El cariotipo del niño con metodología convencional era aparentemente normal. Con técnicas de bandeo G y C se demostró que un cromosoma 9 tenía un brazo corto anómalo. El cariotipo del padre con metodología convencional también era normal, pero con bandeo mostró una translocación recíproca entre los brazos cortos del 9 y del 11, siendo los puntos de rotura 9p12 y 11p11. El niño entonces heredó el der(9)t(9 : 11) (p12 : p11)pat, por segregación adyacente tipo I del cuadrivalente meiótico MI, 22, IV (9 : 11) (p12 : 11). Por lo tanto el niño es trisómico 11p, desde 11p11 hasta 11pter y monosómico 9p. desde 9p12 hasta 9pter. La presente comunicación documenta un caso de trisomía 11p y monosomía 9p transmitida por rearreglo parental no descripta previamente. El fenotipo del propósito concuerda con la monosomía 9p, pero no posee la trigonocefalia, elemento característico de este síndrome, presumiblemente debido a la interacción de las dos mutaciones cromosómicas.

38

Monosomía 4p y trisomía 4p en dos hermanos, transmitida por translocación materna

Marta Gallego, R. Coco, Cristina Zulema Barreiro

Laboratorio de Citogenética, Centro de Investigaciones Endocrinológicas y Sección de Genética Clínica, Hospital de Niños, Buenos Aires

Se conocen dos síndromes por anomalías estructurales parciales del brazo corto del cromosoma No 4 bien definidos y distinguibles clínicamente: el Síndrome de Wolf (deleción 4p-) y la trisomía parcial 4p+ delineada por Rethoré en 1974 a partir de 7 casos. Las características fenotípicas del Síndrome de Wolf son: retardo de crecimiento de origen intrauterino que se acentúa con la edad, encefalopatía severa, microcefalia, y dismorfias faciales características con frente prominente, nariz peculiar que evoca el casco de guerrero griego con punta cuadrada, hipertelorismo ocular, estrabismo divergente, retracción o ptosis del párpado superior, filtrum corto, boca en carpa y micrognatia. Se asocia frecuentemente a otras malformaciones, en particular labio leporino y paladar hendido. La trisomía parcial 4p+ también expresa un fenotipo particular: cara graciosa con frente chata y aspecto de luna, siendo lo más característico de las dismorfias faciales la nariz con punta redondeada y aplasia de los huesos propios que se modifica con el crecimiento tomando el aspecto de nariz de boxeador, hipertelorismo ocular, globos oculares pequeños, filtrum con pilares poco marcados, alteración en la implantación de los

dientes con protrusión de los incisivos superiores, mandíbula prognática y orejas de implantación baja. El retardo mental es marcado. La mayoría de las monosomías 4p- son esporádicas, mientras que las trisomías 4p+ son en su mayoría transmitidas por rearreglos estructurales equilibrados parentales. Se describe por primera vez a dos hermanos con atraso madurativo y dismorfias, uno con clínica de Wolf y otro con fenotipo de trisomía 4p+, con cariotipos específicamente alterados heredados de translocación materna (4;8) (p15; p21). El estudio cromosómico del niño con Síndrome de Wolf con metodología convencional reveló un cariotipo normal, con bandeo G en preparaciones de alta resolución reveló que el brazo corto de un cromosoma No 4 tenía un patrón anómalo de bandas. Este hallazgo motivó el estudio de los padres. El cariotipo de la madre reveló una translocación equilibrada entre los brazos cortos de los cromosomas 4 y 8 : 46, XX,t (4;8) (p15; p21) solamente detectada por bandeo G en preparaciones de alta resolución. El estudio cromosómico de la niña con fenotipo de trisomía 4p+ con metodología convencional también fue normal, pero con bandeo G en preparaciones de alta resolución reveló un brazo corto de un cromosoma 8 con un patrón anómalo de bandas. Los cariotipos de los dos hermanos se interpretaron como resultado de regregación adyacente tipo I del cuadrivalente meiótico materno MI22, IV (4;8) (p15; p21), recibiendo el niño el der(4)mat (8pter → 8p21 :: 4p15 → 4qter) y la niña el der (8)mat (4pter → 4p15 :: 8p21 → 8qter). Por lo tanto el niño es parcialmente deficiente para la pequeña porción distal del 4p desde 4p15 hasta 4pter y parcialmente trisómico para la pequeña porción distal del 8p desde 8p21 hasta 8pter, mientras que la niña es parcialmente trisómica para la pequeña porción distal del 4p desde 4p15 hasta 4pter y parcialmente deficiente para la porción distal 8p desde 8p21 hasta 8pter. Cabe consignar que las alteraciones estructurales parciales del 8p no expresan fenotipos específicos, es por esto los fenotipos de Wolf y trisomía 4p+ presentes en los hermanos.

39

Frecuencia de anomalías cromosómicas en una serie de 60 pacientes varones estériles-infértiles, con espermogramas anormales

R. Coco, S. Brugo Olmedo, Marta Gallego, Mercedes Lovell, C. Carrere, R. Nicholson

Laboratorio de Citogenética, CEDIE, Hospital de Niños, y Consultorio de Fertilidad Masculina, I Cátedra de Ginecología, Universidad de Buenos Aires

En años recientes, se ha establecido que las anomalías cromosómicas pueden ser una de las causas de esterilidad y/o infertilidad. Estas pueden producir bloqueos de la meiosis (dando lugar a oligozoospermia severa o azoospermia) o dar lugar a gametas genéticamente desequilibradas, no viables y fecundantes, las cuales conducen a cigotas que son eliminadas antes de su implantación, o bien dar lugar a abortos espontáneos o a recién nacidos malformados. En pacientes varones que consultan por esterilidad y/o infertilidad, la frecuencia de anomalías cromosómicas mayores varía desde un 2.2 % hasta un 15 %, con una frecuencia promedio del 6.4 %, cifra claramente mayor que la encontrada en la población general adulta (0.6 %). Se presentan los resultados de los hallazgos cromosómicos en una serie de 60 pacientes estériles o infértiles y en una muestra control constituida por 63 individuos. Los estudios cromosómicos se realizaron con metodología convencional y con técnicas de bandeo G y C. Se estudiaron varones sin antecedentes de interés y con fenotipo normal, a quienes se les efectuaron dosajes hormonales de LH, FSH, Testosterona y Prolactina, y por lo menos 2 espermogramas. Se incluyeron en el estudio los pacientes con espermogramas anormales. De los 60 varones estudiados se hallaron: 6 anomalías de cromosomas sexuales (10 %), de las cuales 5 eran desequilibradas (4: 47,XXY y 1: 46,XYqh+/47, XXYqh+)y una equilibrada (46,XX), 3 anomalías de cromosomas autosómicos equilibradas (5 %): 2 translocaciones t(13;14) y una inversión paracéntrica del 10: inv (10) (q11;q25), y 17 anomalías menores (28 %): 2: inv(9), 1: IP(9), 2:

9qh$^+$, 1: 14 ps$^+$, 1: 22ps$^+$, 5: Yqh$^+$ 1: Yqh$^-$ 1: inv(Y), 1: Yqh$^+$,IP(9), 1: 15ps$^+$,IP(9) y 1: 15 p$^-$.En la muestra control no se halló ninguna anomalía mayor, pero sí 14 anomalías menores (22 %): 3: 1qh$^+$, 1: IP(1), 4: IP(9), 2: 15ps$^+$, 2: IP(15), y 2: Yph$^+$. Conclusiones: en la serie de pacientes el 43 % presentaron anomalías cromosómicas (15 % anomalías mayores y 28 % anomalías menores), mientras que en el grupo control se encontró solamente un 22 % de anomalías menores. Si bien los porcentajes de anomalías menores en ambas series no difieren demasiado, es interesante recalcar los hallazgos de determinados heteromorfismos en la serie de pacientes que no se encontraron en el grupo control, tales como el bloque heterocromático del 9 agrandado (9qh$^+$), la inversión pericéntrica del bloque heterocromático del 9 (inv (9)), ausencia del bloque heterocromático del Y, la inversión del bloque heterocromático del Y, el cromosoma 14 con brazo corto agrandado, el 22 con brazo corto grande y el 15 con brazo corto delecionado; como también la mayor frecuencia de Yqh$^+$. Estos resultados corroboran que las anomalías cromosómicas mayores son causa etiológica de: 1) esterilidad, 2) infertilidad, y 3) riesgo aumentado para descendencia anómala, y que determinados heteromorfismos (anomalías menores) también podrían jugar un rol importante en las mencionadas causas.

40

Correlación entre granulopoyesis y citogenética en leucemia mieloide crónica

Catalina C. B. de Di Risio, Mabel Labal de Vinuesa, Mariana Barbich, A. Andino Pavlovsky, Sonia B. de Salum

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

A través de la granulopoyesis in vitro es posible evaluar la capacidad proliferativa de los precursores mielocíticos normales o patológicos. El estudio citogenético permite detectar la presencia de clones anormales caracterizados por alteraciones estables y específicas. Dentro de éstos, el hallazgo del cromosoma Filadelfia (Ph^1) t(9;22) en un paciente dado, confirma la presencia de una leucemia mieloide crónica (LMC). El estudio conjunto de los parámetros de crecimiento in vitro y el estudio citogenético pueden ser utilizados para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades hematológicas. La finalidad de este trabajo es establecer la correlación existente entre ambos estudios y el estado clínico de los pacientes con LMC. Se estudian 35 pacientes con LMC al momento del diagnóstico y vírgenes de tratamiento. Para realizar el análisis de las colonias, las células de médula ósea (MO) y sangre periférica (SP), son cultivadas en agar blando según la técnica de Pike y Robinson. El estudio citogenético se lleva a cabo procesando la MO en forma directa o luego de cultivo a corto plazo. Los preparados son analizados con coloración standar y técnicas de bandeo. Los resultados pueden ser resumidos de la siguiente forma: 1) Casos con gran desarrollo de colonias tanto en MO como en SP, autoestimulación medular elevada y presencia del cromosoma Ph^1 en la casi totalidad de sus metafases. Clínicamente estos pacientes presentan una LMC típica en su fase crónica. 2) Pacientes que presentan pocas colonias o ausencia de las mismas en MO, numerosas microcolonias blásticas y generalmente ausencia de colonias en SP. Conjuntamente se detecta la presencia del cromosoma Ph^1 junto a otras anomalías citogenéticas numéricas y estructurales. El estado clínico es el correspondiente a una crisis blástica. 3) Casos donde el cultivo presenta poco desarrollo de colonias o ausencia de las mismas y el estudio citogenético no se puede realizar por falta de células en división. Los pacientes entran en crisis blástica al poco tiempo con un desenlace fatal. 4) Pacientes con LMC Ph^{1-} (negativo), aunque citogenéticamente diferentes a los casos anteriores, el crecimiento de colonias es similar a lo observado en los casos previamente mencionados. Podemos concluir que las anormalidades observadas en el crecimiento y morfología de las colonias, así como también la presencia de alteraciones citogenéticas aparecen simultáneamente en forma concordante con el desarrollo de la enfermedad.

41

Alteraciones cromosómicas poco frecuentes en desórdenes hematológicos

Mabel Labal de Vinuesa, Irma Slavutsky, Irene Larripa, J. Dupont, Sonia Brieux de Salum

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Son diversas las anomalías cromosómicas específicas descriptas en desórdenes hematolgicos. Las más reconocidas hasta el presente son el cromosoma Filadelfia (Ph^1) en leucemia mieloide crónica, el cromosoma $14q^+$ en linfomas malignos y el $20q^-$ en policitemia vera. Además de estas anomalías de indudable valor diagnóstico en las patologías respectivas, encontramos con cierta frecuencia otras alteraciones de mayor complejidad y de escasa frecuencia. En el presente trabajo se han analizado 15 pacientes, estudiándose en los distintos casos material proveniente de diferente origen: médula ósea, ganglio linfático o derrames ascítico y pleural. En todos los pacientes se efectuó estudio por método directo y por cultivo de corto plazo con medio F-10 con 15 % de suero fetal bovino y antibióticos. Los casos estudiados fueron diagnosticados como: leucemias, linfomas y síndromes preleucémicos, siendo analizados todos ellos al comienzo de la enfermedad. En todos estos pacientes se observaron alteraciones cromosómicas estructurales no relacionadas previamente con las patologías estudiadas. Fueron observados isocromosomas, anillos, duplicaciones y translocaciones, afectando fundamentalmente los cromosomas Nº 1, 2, 3, 7, 13 y 18. Cuando se compararon los hallazgos citogenéticos con la evolución de los pacientes se observó una mala evolución clínica y escasa respuesta al tratamiento en los tres diagnósticos estudiados. Estas detecciones permiten suponer que la aparición de estas anomalías, diferentes de aquellas de valor diagnóstico tendrían una gran importancia como valor pronóstico. dada la progresión clínica observada en los pacientes estudiados. Esta situación demuestra una vez más la importancia de efectuar sistemáticamente el estudio citogenético de estas patologías a fin de aportar mayores datos de ayuda clínica.

42

Análisis de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en pacientes neoplásicos

Irene Larripa, Irma Slavutsky, Mabel Labal de Vinuesa, Mariana Barbich, Sonia Brieux de Salum

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

El ICH es la consecuencia de la ruptura en puntos idénticos de ambas cromátidas hermanas, seguido de posterior intercambio y reparación rápida y completa, sin pérdida de ADN ni cambios en la morfología cromosómica. Este ICH refleja el grado de inestabilidad genética de una célula, y es el resultado de diferentes eventos y lesiones compatibles con la supervivencia celular. Diferentes autores han detectado variaciones de la inestabilidad cromosómica en diversas neoplasias. En el presente trabajo se analiza material proveniente de pacientes con leucemia (10), linfomas (10), tumor de mama (10) y preleucemia (10) analizados al momento del diagnóstico y vírgenes de tratamiento. El estudio se realiza en cultivo de linfocitos de sangre periférica, efectuado en medio F-10 suplementado con 15 % de suero fetal bovino y fitohemaglutinina, adicionando $10 \mu g/ml$ de 5-bromo 2-deoxiuridina (BUDR), durante 72 horas a 37° C. Se toma una población control compuesta de 20 individuos normales (dadores voluntarios). Se analiza un máximo de 20 células por individuo. La población control presenta un valor de 8.9 ± 0.3 intercambios por metafase. En las neoplasias se observa un importante incremento del ICH en linfomas: 11.3 ± 0.5 ($p < 0.001$) así como una franca disminución en leucemias (6.6 ± 1.3) y tumor de mama (6.8 ± 0.8) ambos con un $p < 0.01$. Los estados preleucémicos no muestran diferencias significativas con respecto a la población control siendo su valor de 7.8 ± 0.2. Se destaca la constante diferencia de ICH entre controles y neoplasias, encontrándose los valores de estas últimas por encima o por debajo de los valores de la población control. Los pacientes preleucémicos no presentan diferencias con los controles, las que sí se hacen evidentes en las leucemias.

Esto permitirá considerar en un futuro a esta metodología como un elemento más de seguimiento de los pacientes preleucémicos en franca transformación leucémica. Se considera actualmente que estas modificaciones serían una consecuencia de la enfermedad. Las diferencias de ICH observadas sistemáticamente en neoplasias, con respecto a los controles, nos permiten diferenciar, sin duda ambas poblaciones.

43

Alteración de la actividad tripanócida de leucocitos humanos parcialmente deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Angela M. Casellas, Rita L. Cardoni, Beatriz Iparraguirre, R. Docampo, M. Castro Ríos

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Los leucocitos humanos polimorfonucleares periféricos normales (PMN) fagocitan y destruyen a epimastigotes de *T. cruzi* sensibilizados con anticuerpo de conejo específico (*T. cruzi*-Ac). Con la finalidad de ampliar las evidencias obtenidas previamente con el uso de inhibidores metabólicos estudiamos la respuesta de leucocitos periféricos del paciente P.M., deficiente en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-D) leucocitaria. La historia clínica de P.M. indicaba que había sufrido infecciones bacterianas repetidas. El análisis hematológico mostró una deficiencia de actividad de G-6-D leucocitaria del 25 % y una disminución de actividad de piruvato quinasa y de fosfatasa alcalina leucocitaria. Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y mononucleares (LMN) fueron purificados a partir de sangre periférica de un individuo normal y del paciente P.M. por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque. Se graficó el consumo de O_2 de PMN en condiciones basales y luego del agregado de *T. cruzi*-Ac. Se determinó el porcentaje de PMN que fagocitaron *T. cruzi*-Ac en extendidos coloreados con May Grunwald Giemsa y la citotoxicidad de PMN se determinó por el porcentaje de radioactividad liberado al sobrenadante luego de la interacción con parásitos marcados con 3H-uridina. Se realizó el estudio comparativo in vitro de la respuesta de PMN y LMN normales y del paciente P.M. frente a *T. cruzi* sensibilizados. Los PMN del paciente P.M. mostraron un 62 % de inhibición en el consumo de O_2 estimulados por el *T. cruzi*-Ac con respecto al normal, siendo los niveles de 6.9 y 18.2 nmoles/min/10^7 PMN respectivamente. El porcentaje de PMN del paciente P.M. involucrados en la fagocitosis de *T. cruzi*-Ac fue similar al normal, siendo de 31 % y 32 % respectivamente. Se observó una disminución de la capacidad citotóxica contra *T. cruzi*-Ac de los leucocitos periféricos del paciente P.M. con respecto al normal; la citotoxicidad de PMN de P.M. estuvo inhibida en un 30 % mientras que la de los LMN de P.M. mostró un 80 % de inhibición. En resumen, los PMN del paciente P.M. deficientes en G-6-D mostraron una capacidad fagocítica normal frente a *T. cruzi*-Ac. Sin embargo, la deficiencia en G-6-D se tradujo en un menor consumo de O_2 durante la interacción con *T. cruzi*-Ac con una disminución de la capacidad citotóxica, tanto de los PMN como de los LMN. Estos resultados confirman y amplían las evidencias sobre la importancia del aumento de la actividad del ciclo de las hexosas monofosfato durante la lisis de *T. cruzi* sensibilizados por PMN humanos.

44

Mecanismos de hemólisis inducida por drogas oxidantes

Beatriz Iparraguirre de Weinstein, Beatriz Erramouspe, J. Timpanaro

Servicio de Hematología, Hospital Francés, Buenos Aires

La inducción de anemia hemolítica por drogas puede obedecer a diferentes mecanismos: 1) reacciones mediadas inmunológicamente, 2) efecto directo sobre la membrana del eritrocito, 3) alteración de la eritropoyesis por drogas, resultando en producción de eritrocitos dañados, 4) oxidación de hemoglobinas inestables, 5) oxidación de las proteínas normales del glóbulo rojo por sobredosis de droga, 6) oxidación por dosis standard de droga so-

bre eritrocitos con un inadecuado sistema enzimático protector. Este último mecanismo es el determinante más común de la hemólisis inducida por drogas y generalmente se asocia a deficiencia de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-PD), pero también se observa en deficiencias de otras enzimas que intervienen en la regulación de los niveles de glutatión reducido (GSH). Se estudiaron dos pacientes, una con deficiencia de glutatión peroxidasa (GSH-Px) y otra con deficiencia de glutatión sintetasa (GSH-sintetasa). En ambas el diagnóstico se hizo a partir de un episodio de anemia hemolítica provocado por la administración de trimetoprima y ácido nalidíxico respectivamente. Se dosó en eritrocitos GSH, G-6-PD, GSH-reductasa, GSH-Px-sintetasa, piruvato kinasa y se investigó la presencia de hemoglobinas inestables. La actividad del shunt de la hexosa monofosfato (HMP) se midió según Jacob y Jandl, en eritrocitos incubados en presencia de azul de metileno, ácido ascórbico, cianuro de potasio, glucosa y nitrito y se investigó la formación de cuerpos de Heinz (CH) espontáneos y con acetilfenilhidrazina. En ambas pacientes se obtuvieron valores disminuidos de GSH, en una por deficiencia de GSH-Px y en otra por deficiencia de GSH-sintetasa. En los eritrocitos deficientes en GSH-Px se encontró aumento de metahemoglobina inducida por nitrito en presencia de azul de metileno y glucosa y valores normales de sulfohemoglobina provocada por ácido ascórbico y cianuro. Inversamente, en los eritrocitos deficientes en GSH-sintetasa se hallaron niveles normales de metahemoglobina inducida por nitrito y aumento de sulfohemoglobina por ácido ascórbico y cianuro de potasio. Los hematíes de ambas pacientes presentaron aumento del número de cuerpos de Heinz después de la exposición a la acetilfenilhidrazina. La actividad metabólica de los eritrocitos normales, produce peróxidos que son degradados a través del shunt HMP y del sistema GSH. El efecto hemolítico de las drogas oxidantes en la deficiencia de GSH-Px y de GSH-sintetasa se debería a la producción de peróxidos, en concentraciones mayores de las que pueden ser metabolizadas, cuando estos sistemas son deficientes. Dependiendo de cuál sea la enzima deficitaria, se forma metahemoglobina o sulfohemoglobina, la hemoglobina se precipita formando cuerpos de Heinz y finalmente ocurre la destrucción de los eritrocitos. Se destaca la relación entre infección y hemólisis en estos casos de hematíes enzimáticamente deficientes.

45

Variaciones de la actividad de la enzima 3-hidroxibutirato deshidrogenasa hepática (BHBD) durante el desarrollo de la rata

C. R. Ricci, Clara María C. de Brignone, J. A. Brignone

Instituto de Química Biológica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

En trabajos anteriores se demostró que los tratamientos de ratas con estilbestrol, 17 β-estradiol o mestranol disminuyeron la actividad específica de la BHBD después de cortos períodos de inyección o administración oral de esos estrógenos. En cambio la testosterona no tuvo acción significativa sobre la actividad de la enzima. J. A. Brignone y col. *Medicina (Bs Aires)* 38: 413, 1978. Esa actividad es mayor en machos que en hembras J. A. Brignone y col. *Medicina (Bs Aires)* 39: 471, 1979; y esa menor actividad de las hembras se atribuyó a los estrógenos circulantes. En este trabajo se investigó la influencia de la maduración de la rata sobre la actividad específica BHBD. Las condiciones fueron las mismas que en los trabajos anteriormente mencionados y consistió en la medida espectrofotométrica de la actividad BHBD a 340 nm. Los resultados fueron expresados en μm de NAD reducido/min/mg proteína según la siguiente reacción:

D L-3-hidroxibutirato +

$+ NAD^+ \rightleftharpoons$ Acetoacetato + NADH + H^+

Se consideraron grupos de ratas hembras de 7, 14, 32, 49 y 90 días. Las hembras de 7 días mostraron valores de la actividad de la enzima casi 100 % mayores que las maduras de 90 días, 108 $\pm$ 13.5 (7) (entre paréntesis número de casos) Vs

56 ± 2.5 (9) respectivamente. En las edades siguientes las actividades de esa enzima de ratas hembras fue disminuyendo paulatinamente, pero todavía a los 49 días esa actividad estaba 27 % por encima de los valores, correspondiente de las ratas adultas, 71 ± 2.5 (8) Vs 56 ± 2.5 (9). En cambio en ratas macho la actividad BHBD a los 7 días era menor que la de machos adultos de 90 días; 69 ± 5.1 (8) Vs 93 ± 3.4 (9) respectivamente. Con los datos obtenidos se realizó un gráfico comparativo de la actividad específica de la BHBD en función del peso de los animales de diferentes edades y se observó que los valores correspondientes a hembras entre 7 y 90 días de edad presentó un decrecimiento de tipo exponencial. La representación gráfica del logaritmo de la actividad específica en función del peso del animal resultó una recta con un grado de correlación $r = 0.724 \pm 0.164$ y $p < 0.001$. Es importante esta diferencia sexual de la actividad de la BHBD a través de la feminización hepática de la rata por tratarse de una enzima mitocondrial, de gran importancia metabólica.

46

Efecto de la vinblastina sobre la secreción biliar y la ultraestructura hepática en la rata

Marta Dubin, O. R. Koch

Instituto de Química Biológica y Centro de Patología Experimental, II Cátedra de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Trabajos previos han demostrado que la administración de un agente antimicrotubular, colchicina, produce una disminución en la respuesta colerética al taurocolato de Na (Dubin et al *Gastroenterology* 79: 646, 1980). El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de otra droga antimicrotubular, sulfato de vinblastina (velbe), sobre la secreción biliar y la ultraestructura hepática, en la rata. A 6 animales se le sadministró el velbe ev a la dosis de 2 mg/100 g p.c. El grupo control (n = 6) recibió ClNa 0.15 M. A las 2 hs se canuló el colédoco obteniéndose muestras de bilis cada 10 min durante 30 min (período basal), y posteriormente se efectuó una inyección única de taurocolato de Na (TC Na) (10 μm/100 g p.c., ev) obteniéndose muestras cada minuto, durante 10 min. El dosaje de ácidos biliares se efectuó por espectrofotometría. Estudios morfológicos fueron realizados en muestras obtenidas en animales, tratados en la misma forma (velbe n = 4, controles n = 3), y procesadas para microscopía de luz y electrónica. Durante el período basal, tanto el flujo biliar (FB) como la tasa de excreción de ácidos biliares (TAB) no se modificaron por la administración del velbe; sin embargo, luego de la estimulación con TCNa, ambos parámetros disminuyeron significativamente. En los animales tratados el FB disminuyó a los 3 min en un 43 %, mientras que en los controles aumentó en un 105 %. A los 10 min el FB retornó al valor basal en los controles, mientras que en los tratados disminuyó 77 % respecto del valor basal. La TAB mostró una curva similar a la del FB: a los 3 min aumentó 46 % en los controles y en los tratados sólo un 14 %; a los 10 min permaneció ligeramente elevada (53 %) en los controles, mientras que en los tratados disminuyó en un 57 %. Con microscopía de luz no se observaron modificaciones en la histología hepática. En cambio, el estudio ultraestructural reveló alteraciones significativas en los animales tratados; éstas consistieron en la desaparición de los microtúbulos, marcada hipertrofia de la zona de Golgi con dilatación de los sacos y vesículas y un incremento del contenido de lipoproteínas, esta alteración fue particularmente relevante en la zona pericanalicular en donde se acompañó ocasionalmente de vacuolas autofágicas. A nivel mitocondrial se observó un incremento de la densidad matrical con reducción del número de crestas; estas mitocondrias alternaban con mitocondrias normales o conformaban la totalidad de la población mitocondrial. También se pudieron detectar numerosas figuras de partición mitocondrial tanto en mi-

tocondrias normales como en aquellas de alta densidad electrónica. Estos resultados confirman la hipótesis de la participación de los microtúbulos en la secreción de ácidos biliares y en la elaboración de la fracción dependiente de estos últimos. Por otra parte, el hallazgo de importantes modificaciones mitocondriales sugiere una acción directa o indirecta del velbe sobre estas organelas.

47

Inhibición del sistema microsomal hepático metabolizante de drogas por el antiparasitario benznidazol

M. I. Masana, E. G. D. de Toranzo, J. A. Castro, M. C. Rubio

Centro de Investigaciones Toxicológicas CEITOX, Villa Martelli e ININFA (CONICET), Buenos Aires

Varios compuestos del tipo nitroimidazol son utilizados corrientemente como agentes antiparasitarios, entre ellos el derivado 5-nitroimidazol, Metronidazol, activo contra la *Trichomonas vaginalis*, o el derivado 2-nitroimidazol, Benznidazol (Bz), activo contra el *Tripanosoma cruzi*. Este último compuesto, el N-bencil-2-nitro-1-imidazolacetamida, es utilizado en la terapéutica contra la enfermedad de Chagas, tanto en su forma aguda como crónica. Dada la magnitud del problema sanitario que constituye esta enfermedad para nuestro país y que los pacientes chagásicos a menudo reciben más de una droga simultáneamente se consideró de interés el estudio farmacológico de la interacción del Benznidazol con el sistema microsomal hepático metabolizante de drogas. Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley de 200-300 g y se determinaron varios parámetros del metabolismo oxidativo por el sistema oxidasa de función mixta (según métodos descriptos por Castro J.A. y Gillette J.R., *Biochem Biophys Res Commun* 28: 426, 1967). 1, 3 y 6 horas después de la administración ip de 30 mg/kg de Benznidazol en suspensión de Carboximetilcelulosa 1 %. En todos los casos se expresa la media ± la desviación standard de 6 animales por grupo. El tiempo de sueño inducido por 40 mg/kg de pentobarbital, que fue de 68 ± 17 minutos en los controles, se incrementó en la misma magnitud, tanto a la hora como a las 3 y 6 horas después de la administración de la droga: 165 ± 41 minutos (243 %), 156 ± 43 minutos (229 %) y 153 ± 25 minutos (225 %) respectivamente. Este efecto del Benznidazol parece ser debido a una inhibición del sistema microsomal hepático metabolizante de drogas, ya que la actividad enzimática de la aminopirina demetilasa está disminuida en los microsomas de hígado de ratas tratadas con Benznidazol, 30 % a la hora (control: 129.1 ± 20.7 nmoles/mg proteína/30 minutos, Bz: 88.9 ± 9.7 nmoles/mg proteína/30 minutos, $p < 0.005$) y 40 % a las 3 horas (control: 87.3 ± 6.0 nmoles/mg proteína/30 minutos, Bz: 54.5 ± 8.3 nmoles/mg proteína/30 minutos, $p < 0.005$). La causa de esta inhibición sobre el sistema microsomal no se debería fundamentalmente a la destrucción del citocromo P_{450}, ya que el contenido de esta proteína sólo se redujo un 20 % a las 6 horas (control: 0.43 ± 0.02 nmoles/mg de proteína, Bz: 0.34 ± 0.05 nmoles/mg de proteína, $p < 0.01$). La actividad de la citocromo *c* reductasa tampoco fue afectada por el tratamiento con el Benznidazol (actividad enzimática control: 38.7 ± 2.7 nmoles/30 minutos/mg de proteína). En conclusión, el agente antiparasitario Benznidazol parecería ser un inhibidor no competitivo del sistema microsomal hepático metabolizante de drogas, por un mecanismo aún no dilucidado.

48

Efecto del nifurtimox sobre los ácidos nucleicos del T. cruzi

Silvia G. Goijman, A. C. C. Frasch, Silvia N. J. Moreno, R. Docampo, A. O. M. Stoppani

Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Los nitrofuranos son tóxicos para una serie de microorganismos, y en algunas situaciones son útiles con fines terapéuticos o profilácticos. Un nitrofurano, el nifurtimox, se utiliza frecuentemente en la terapia de la enfermedad de Chagas. El

agente causal de la misma, el *Trypanosoma cruzi*, muere rápidamente cuando se lo expone a nitrofuranos como nitrofurazona, nifurtimox, o SQ 18506. El DNA es el sitio de acción más importante del SQ 18506 en *T. cruzi*, y el daño del mismo resulta en la inhibición de la síntesis de macromoléculas. El metabolismo de los nitrofuranos implica su metabolización por enzimas que incluyen la xantino oxidasa, la NADPH citocromo *c* reductasa y la aldehído oxidasa. En aerobiosis la reducción del mismo resulta en la formación del radical aniónico ($ArNO_2^{\cdot-}$) que es capaz de reaccionar con oxígeno molecular para dar anión superóxido, luego peróxido de hidrógeno, y luego, por la reacción de Haber Weiss catalizada por hierro, OH·, un radical que causa daño biológico y modificaciones en el DNA. En condiciones anaeróbicas, el nitrocompuesto, da lugar a la formación del nitrosoderivado, luego la hidroxilamina y finalmente el aminoderivado. Para analizar el efecto del nifurtimox sobre el DNA, se usó DNA de *T. cruzi* y nifurtimox metabolizado por la fracción microsomal de hígado de rata. Se incubó DNA de *T. cruzi* con nifurtimox (1/5 nifurtimox/nucleótido) con microsomas y un sistema generador de NADPH, durante 1 h a 37° C en aerobiosis. Para evitar degradación del DNA por nucleasas presentes en los microsomas, se separó el DNA del medio de incubación por medio de un filtro de millipore de 0.2 μm. Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa desnaturalizantes. Se observó que el DNA degrada hasta fragmentos de 0.17 kpb. debido a un derivado del nifurtimox capaz de producir rupturas aún en ausencia del sistema generador de NADPH. En estas últimas condiciones tampoco se observó la formación del radical aniónico del nifurtimox ($ArNO_2^{\cdot-}$) o de los productos derivados de la reducción parcial del oxígeno (anión superóxido y peróxido de hidrógeno). En una segunda etapa se preincubó el nifurtimox con microsomas a 37° C durante 1 h, luego se calentó la mezcla a 90° C durante 20 min., se centrifugó y el sobrenadante se incubó con DNA de *T. cruzi*, observándose el mismo tipo de ruptura. Se puede concluir que: *a*) el nifurtimox debe ser metabolizado para producir rupturas en el DNA; *b*) el compuesto formado no es un producto de reducción del mismo, ya que en el medio de incubación no había NADPH; *c*) los resultados obtenidos no son debidos a radicales libres del oxígeno. Por otra parte el sistema usado no permitiría ver ruptura por radicales libres; *d*) el compuesto formado es termoestable, y *e*) en la fracción microsomal hay enzimas capaces de metabolizar el nifurtimox, formándose un compuesto que daña los ácidos nucleicos.

49

Contenido en citocromos de mitocondrias musculares y hepáticas de ratas diabéticas

Susana L. S. de Favelukes, Martha N. S. de Tarlovsky, Blanca N. Badano, A. O. M. Stopanni

Instituto de Química Biológica, Centro de Investigaciones Bionergéticas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La información existente sobre las modificaciones de los citocromos mitocondriales en la diabetes es contradictoria. Lerner y col (*J Biol Chem* 247: 1513 (1972)) encontraron disminución de los citocromos aa_3 y *c*, y de la citocromo oxidasa hepática en ratas diabéticas por aloxano; Boveris y col (*Proc Soc Exptl Biol Med* 132: 170 (1969)) observaron variaciones no significativas del citocromo *c* en ratas diabéticas por pancreatectomía, mientras que Schaffer y Nagel (*Biochim Biophys Acta* 162: 617 (1968)) encontraron disminución de los citocromos aa_3 y *c* en ratas normales inyectadas con insulina. En este trabajo se determinó el contenido en citocromos de las mitocondrias de músculo esquelético e hígado de ratas diabéticas por estreptozotocina (60 mg/kg, única dosis) 30 días después de inducir la diabetes. Después del sacrificio las mitocondrias se aislaron según Favelukes y col (*Acta Physiol Latinoamer* 21: 30 (1971)) y el contenido en citocromos se determinó según Williams (*Arch Biochem Biophys* 107: 537 (1964)). Se obtuvieron los siguientes resultados (en nmol/mg de proteína mitocondial; promedio de 11 ratas ± D.E.). Músculo esquelético normal: citocromo aa_3, 0.70 ± 0.03; *b*, 0.57 ±

0.03; c_1, 0.25 ± 0.03; c, 0.65 ± 0.04. Músculo esquelético diabético: citocromo aa_3, 0.46 ± 0.04; b, 0.38 ± 0.03; c_1, 0.16 ± 0.02; c, 0.53 ± 0.04. Hígado normal: citocromo aa_3, 0.26 ± 0.01; b, 0.29 ± 0.02; c_1, 0.17 ± 0.01; c, 0.32 ± 0.02: Hígado diabético: citocromo aa_3, 0.42 ± 0.02; b, 0.33 ± 0.02; c_1, 0.18 ± 0.01; c, 0.32 ± 0.01. El contraste entre las mitocondrias de músculo e hígado es notable pues en el primer caso hubo disminución significativa ($p < 0.001$) de los citocromos aa_3 y b (en parte de origen mitocondrial) mientras que en los de hígado no hubo disminución (citocromos b, c_1 y c) o se produjo aumento (citocromo aa_3). En concordancia con el aumento de este último citocromo se comprobó aumento de la citocromo oxidasa hepática (en μmol citocromo c oxidado/min/mg de proteína ± S.D.; 9 ratas); normales, 1.88 ± 0.17; diabéticas, 3.23 ± 0.26 ($p < 0.001$). La disminución del contenido en citocromos en las mitocondrias de músculo esquelético diabético, que concuerda con la menor síntesis de proteínas en esas membranas observada por Favelukes y col., se debe a la utilización de los aminoácidos para gluconeogénesis mientras que el aumento del citocromo aa_3 y la citocromo oxidasa hepática concuerdan con el aumento de oxidación de ácidos grasos en el hígado diabético.

50

Efecto de la bilirrubina no conjugada (BNC) sobre los contenidos iónicos de eritrocitos fetales

RAQUEL ELENA SERRANI, INÉS ANA GIOIA

Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

Los eritrocitos circulantes contribuyen a la capacidad de reserva de fijación de BNC en recién nacidos y constituyen además un modelo apto para el estudio de las acciones celulares de dicha sustancia. En el presente trabajo se estudia in vitro el efecto de la BNC solubilizada con albúmina (ALB) sobre los contenidos de sodio, potasio y cloro de los eritrocitos proveniente de sangre de cordón umbilical de niños recién nacidos normales. Los valores controles obtenidos fueron expresados en mmoles l^{-1} células y correspondieron a: (Cl^-) 65.53 ± 3.46 (15), (K^+) 104.77 ± 3.14 (12) y (Na^+) 17.69 ± 1.55 (12). La incubación de los eritrocitos con BNC (rango 0.1 – 04 mM) mostró una alteración de los contenidos iónicos intracelulares que dependía tanto de la concentración total de BNC como de la relación molar BNC/ALB empleada. A relación molar (BNC/ALB) 10/1 se observó, con respecto a los valores controles una disminución del contenido de potasio del 10 y 50 % a la menor y mayor concentración de BNC estudiada respectivamente. Modificaciones análogas se obtuvieron en lo que al contenido de cloro se refiere. El contenido intracelular de sodio aumentó a 43.7 ± 2.16 (5) mmoles l^{-1} cél. La reducción del contenido de potasio no sería debido solamente a la inhibición de los componentes activos de influjo. A relación molar (BNC/ALB) 2/1 la reducción del contenido de potasio fue observada solamente a la mayor concentración de BNC testada, siendo la misma de un 30 % en relación al valor control. En cuanto al contenido de sodio, éste mostró un incremento que fue función de la concentración total de BNC. Con respecto al contenido de cloro es de hacer notar que aun en ausencia de la alteración de los otros iones estudiados, se modificó en forma significativa en el sentido de una disminución con respecto al valor hallado en los controles. Dicha disminución varió en forma proporcional a la concentración de BNC del medio de incubación. Los resultados presentados sugieren una modificación de los componentes pasivos de los flujos iónicos por efecto del tratamiento con BNC. La distribución de cloro sugeriría un nuevo estado de equilibrio del mismo en el que podrían intervenir diferencias de polaridad de membrana celular o de la fracción de anión hemoglobina.

51

Efecto del 1.25-Dihidroxicolecalciferol sobre el metabolismo del hierro en la rata

ADRIANA DUSSO, D. ALLOATTI, R. C. PUCHE
C. PUCHE

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

Este trabajo tiene como objetivo investigar el metabolismo del hierro en la rata tratada con 1.25-DHCC que produce una depresión de la actividad hemocitopoyética de la médula ósea. Los animales (200 g de peso promedio) fueron alimentados con una dieta semisintética (harina integral, caseína y sales; 85:12:3) con un contenido de hierro de 500 microgramos de hierro/gramo y recibieron una dosis diaria de 0.5 microgramos de 1.25-DHCC por cada 100 g de peso, por vía oral durante 15 días. Después de la primera semana de tratamiento, la absorción intestinal de hierro se vio favorecida (absorción neta de hierro: $C = 690 \pm 150$ μg/d/100 g peso; $T = 1560 \pm 121$, $p < 0.01$). Esta diferencia es tanto más notable si se tiene en cuenta que el tratamiento reduce la ingesta. La eficiencia de absorción de Fe en los controles fue de 18.2 ± 7.0 % mientras que en los tratados fue de 43.3 ± 4.6 % ($p < 0.01$). El tratamiento produce un aumento de los depósitos de hierro ferritínico en hígado ($C = 27.8 \pm 3.7$ μg/g de hígado; $T = 45.7 \pm 4.8$, $p < 0.01$) sin aumento significativo de la concentración de ferritina (proteína). Este resultado se debe a por lo menos tres factores: A) aumento en la absorción neta de hierro, comprobado al administrar por vía intraperitoneal una dosis diaria de hierro equivalente a la diferencia de absorción neta del experimento anterior ($C = 24.5 \pm 2.0$ μg Fe/g hígado; $C + Fe = 43.0 \pm 4.1$, $p < 0.01$). B) un efecto adicional del esteroide demostrado por tratamiento simultáneo con hierro intraperitoneal y 1.25-DHCC. En estas condiciones la absorción neta de hierro se reduce, no discrepa de la de los controles tratados con hierro intraperitoneal y sin embargo se produce un aumento adicional en el depósito de hierro ferritínico (59.0 ± 2.8 μg Fe/g hígado, $p < 0.05$). C) el efecto adverso del tratamiento con 1.25-DHCC sobre la médula ósea como lo demuestra la disminuida incorporación de hierro radioactivo a la masa roja circulante. La excreción urinaria de hierro de los animales tratados con 1.25-DHCC no discrepa de sus controles simultáneos. Cuando al tratamiento anterior se agrega la inyección intraperitoneal de hierro su excreción urinaria aumenta en función de la citricuria. El agregado de citrato de sodio a la dieta aumenta aun más las excreciones de hierro y citrato ($r = 0.89$, $p < 0.001$).

52

Activación e inhibición de la generación de radicales superóxido en la fisiopatología de la inflamación reumatoide

F. R. ROISMAN, A. E. FINKELSTEIN

Departamento de Reumatología-Inmunología, Fundación CIMAE, Buenos Aires

El sistema fagocítico desempeña un importante rol en los procesos inflamatorios fundamentalmente a través de su capacidad de segregar al medio extracelular diversas sustancias biológicamente activas. Entre los componentes que se destacan por su toxicidad tisular figuran los radicales libres derivados del oxígeno, esencialmente el radical superóxido (O_2^-) y sus productos de reacción H_2O_2 y OH. Por otra parte hemos observado que el polisacárido dextran (Dx) es capaz de inducir exacerbaciones de la inflamación en pacientes de artritis reumatoide (AR), y es aceptado que los compuestos áuricos son efectivos en la terapia de esta enfermedad. En este trabajo se analizó la acción del Dx y de dos compuestos áuricos sobre la generación de anión superóxido por leucocitos humanos. Como modelo experimental se emplearon dos sistemas que representan los procesos in vivo: *a*) un sistema de fagocitosis por leucocitos humanos de complejos inmunes (CI) del tipo IgG-IgM factor reumatoide, y *b*) fagocitosis frustrada por exposición de las células a CI adheridos a superficies no fagocitables (filtros millipore). Empleando estos modelos se analizó la acción del Dx de diferentes pesos moleculares ($2\text{-}50 \times 10^4$) y a diferentes concentraciones y de dos compuestos áuricos,

auranofin* (AF), oral, y aurotiomalato sódico (ATS), inyectable. La generación de radicales superóxido fue evaluada por la reducción del ferricitocromo C 0.08 mM, y del nitroblue de tetrazolio (NBT) 0.1 % por valoración del formazán en extractos piridínicos de las células. Como resultados, el Dx presentó un efecto estimulante en la generación de radicales superóxido, siendo esta acción máxima para un PM de 7×10^4, y a niveles de 15-20 mg/ml. La reducción de ferricitocromo C presentó un incremento de 4.5 ± 0.4 nmoles por 10^6 células ($p < 0.01$) en presencia de Dx 20 mg/ml; el test de NBT mostró un incremento del 55 % a concentraciones similares. La preincubación de los leucocitos con AF demostró una potente acción inhibidora en ambos sistemas; durante la fagocitosis de CI, niveles de 5 μm, similares a los valores sanguíneos de los pacientes tratados con AF, produjeron un 72 % de inhibición (control: 3.7 ± 0.2 nmoles/10^6 cel., AF 5 μm: 1.0 ± 0.2 nmoles/10^6 cel., $p < 0.01$); niveles superiores a 10 μm producen un 100 % de inhibición. En la fagocitosis frustrada se obtuvo un 46.8 % de inhibición a niveles de 5 μM. Con el NBT se observó un 53.9 % de inhibición a iguales concentraciones. El ATS presentó una acción menor (15 %) con niveles superiores a 100 μM. El efecto inhibitorio se manutvo cuando los leucocitos incubados con el AF fueron lavados previamente a su exposición a los CI, sugiriendo una acción a nivel de la membrana celular y la incubación de los leucocitos en un medio conteniendo ditiotreitol (1 mM) previno totalmente la acción inhibidora del AF, indicando una posible interacción con grupos SH^- de la membrana. En conclusión, se postula que 1) la modulación farmacológica de la producción de radicales superóxidos durante la inmunofagocitosis juega un rol importante en la fisiopatología de la inflamación reumatoidea y 2) las exacerbaciones observadas en la AR podrían ser debidas a la acción adyuvante de polisacáridos de origen bacteriano o viral sobre el sistema fagocítico.

* (2, 3, 4, 6-tetra-O-acetil-1-tio-B-D-glucopiranosato-S) (trietilfosfina)Au.

53

Efectos de la aflatoxina B_1 sobre la función renal. I: Estudios en animal entero

MARTA E. GROSMAN, MARÍA M. ELÍAS, E. J. COMÍN, E. A. RODRÍGUEZ GARAY

Instituto de Fisiología Experimental, Facultad de Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional de Rosario

Dentro de las aflatoxinas, micotoxinas de acción cancerígena en animales y en el hombre, la aflatoxina B_1 (AFB) es la de mayor toxicidad. Algunas micotoxinas resultan nefrotóxicas por lo cual resultó de interés estudiar el efecto de la AFB sobre la función renal global, en condiciones de intoxicación aguda. Se utilizaron ratas Wistar machos (300-350 g) distribuidas en dos grupos experimentales: testigos e intoxicados. Estos últimos recibieron 48 h antes del experimento una dosis única de AFB (10 μg/100 g de peso corporal). Dicha dosis fue elegida en base a estudios previos (inéditos) que demostraron que no es letal en ratas pero capaz de provocar alteraciones hepáticas (aumento de la actividad SDH plasmática y cambios morfológicos). Se efectuaron los siguientes estudios in vivo: *a*) técnicas de clearance convencionales, a fin de obtener datos sobre la velocidad de filtración glomerular (VFG), la velocidad de secreción de ácido p-aminohipúrico (PAH) y de reabsorción de sodio; *b*) recolección de orina en ratas con libre acceso al agua y alimento para su análisis químico (pH, proteínas, glucosa), y *c*) ratas con privación de agua y alimentos desde 24 h antes del experimento a fin de determinar la capacidad máxima de concentración de la orina. *a*) Se efectuó la infusión iv de una solución conteniendo inulina (10 mM), PAH (30-60 mM) y manitol (220 mM) a una velocidad de 5 ml/h. Después de 2 h necesarias para alcanzar el equilibrio, se determinaron 3 períodos sucesivos de clearance de 20 min cada uno. Las muestras de sangre se recogieron en la mitad de cada período a través de un catéter colocado en la arteria femoral. La recolección de orina se efectuó a través de un catéter vesical. En cada una de las muestras se

determinaron las concentraciones de PAH, inulina y sodio, calculándose las velocidades de filtración glomerular, de secreción de PAH y de reabsorción de sodio. Existieron diferencias significativas en la VFG entre testigos y tratados (0.45 ± 0.02, $n = 53$ y 0.34 ± 0.02, $n = 50$ ($p < 0.01$). El porcentaje de sodio reabsorbido en los testigos fue de 98 % $\pm$ 0.03 ($n = 35$) y en los tratados de 96 % $\pm$ 0.03 ($n = 25$) ($p < 0.01$). El análisis gráfico de la velocidad de excreción de PAH en función de la concentración plasmática del mismo en los testigos, reveló que el Tm de PAH se obtuvo a una concentración plasmática mayor de 200 mg/l, con un valor de 0.222 mg/min/100 g $\pm$ 0.002, $n = 15$. En los tratados dicho valor fue de 0.108 mg/min/100 g $\pm$ 0.010, $n = 33$ ($p < 0.001$) obtenido a una concentración plasmática de PAH de 120 mg/l. *b*) No existieron diferencias en los valores de pH, ni se detectó glucosuria o proteinuria manifiesta, en ninguno de ambos grupos. *c*) Las asmolaridades de la orina fueron de 2.500 mOsm/kg agua $\pm$ 230 ($n = 4$) en los testigos, 1.425 $\pm$ 420 ($n = 4$) a las 24 h de la inyección de AFB y 865 $\pm$ 260 ($n = 3$) a las 48 h de efectuada la misma. Los resultados obtenidos permiten sugerir que AFB, a la dosis inyectada, provoca alteraciones de la función renal en ratas, principalmente de los túbulos proximales y distales.

54

Efectos de la aflatoxina B_1 sobre la función renal. II. Estudios in vitro

María M. Elías, Marta Grosman, E. J. Comín, E. A. Rodríguez Garay

Instituto de Fisiología Experimental, Facultad de Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional de Rosario

Se pudo observar en animal entero que la aflatoxina B_1 (AFB) es capaz de disminuir la velocidad máxima de secreción tubular de ácido p-aminohipúrico (PAH). Resultó de interés analizar los posibles mecanismos involucrados en dicho efecto, mediante la utilización de cortes de corteza renal de ratas testigos (dimetil sulfóxido, ip) y tratadas (10 μg AFB/100 gip). Los cortes fueron obtenidos manualmente según técnicas convencionales. Las incubaciones se efectuaron a 27° C en un baño con agitación y en atmósfera de oxígeno. El medio de incubación fue una solución Ringer Krebs enriquecida con acetato de sodio (10 mM). Las preparaciones fueron sometidas durante 20 min a un período de preincubación. Se analizaron los siguientes parámetros: *a)* acumulación de PAH por el tejido, *b)* cinética de captación de PAH y *c)* distribución de agua y electrolitos. *a)* Después del período de preincubación, se agregó el medio PAH (7×10^{-5} M) e inulina (4 mg/ml) y se continuó la incubación durante 60 min, después de lo cual el tejido separado del medio, fue secado y pesado. Se determinaron las concentraciones de PAH e inulina en el homogenado de tejido húmedo y en el medio. Los resultados se expresaron como relación S/M, donde S = mg PAH/g tejido húmedo y M = mg PAH/ml de medio. También se determinó el espacio de inulina. *b)* Se utilizaron concentraciones variables de PAH (50 a 2000 μM). El período de incubación fue de 15 min, al final del cual los cortes se trataron como en el grupo anterior. Los parámetros cinéticos Km y Vm se determinaron gráficamente. La velocidad de captación de PAH fue corregida por sustracción del PAH extracelular. *c)* Se utilizaron métodos preestablecidos, siendo los resultados referentes a los electrolitos (Na^+ y K^+) expresados como mEq/kg de agua intracelular. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: *a)* La relación S/M de cortes de ratas testigos fue 3.07 ± 0.10 ($n = 26$); en los obtenidos de animales tratados 24 h antes del experimento, fue 2.88 ± 0.19 ($n = 8$) (NS); 2.40 ± 0.20 ($n = 10$) en los cortes de animales tratados 48 h antes del experimento ($p < 0.001$) v 2.33 ± 0.17 ($n = 7$) ($p < 0.001$) en los cortes tratados 24 h antes del experimento, pero con una dosis mayor de AFB (20 μg/100 g). *b)* La cinética de captación en los testigos reveló un valor de Vm de 0.475 μmoles/g/15 min y un Km de 0.22 mM. Los cortes de ratas tratadas mostraron valores de Vm de 0.400 μmoles/g/15 min y un Km de 0.17 mM. *c)* No existieron diferencias significativas del agua total y extracelular entre los distintos grupos, pero la concentración de

sodio intracelular aumentó de 55 ± 11 (n = 3) en los cortes de ratas testigos, a 160 ± 14 (n = 6) en los cortes de ratas tratadas ($p < 0.01$). La concentración intracelular de potasio mostró una tendencia a disminuir de 52 ± 6 (n = 7) a 38.5 ± 1 (n = 6), sin que la diferencia tuviera significación estadística. Los resultados confirman la alteración funcional de los túbulos corticales renales por la AFB o algún posible metabolito de la misma, sugerida por los estudios realizados en animal entero.

55

Efectos de la aflatoxina B_1 sobre el flujo biliar y el transporte hepático de la sulfobromoftaleína

María Cristina Carrillo, J. A. Monti, J. V. Rodríguez, E. A. Rodríguez Garay

Instituto de Fisiología Experimental, Facultad de Ciencias Bioquímicas, Universidad de Rosario

Las aflatoxinas representan un grupo de micotoxinas de potente acción carcinogénica en muchas especies animales, incluyendo al hombre. Dentro de este grupo de toxinas, la de mayor toxicidad es la aflatoxina B_1 (AFB). A fin de analizar el efecto de la AFB sobre la función hepática, se estudiaron distintos parámetros para su evaluación en ratas Wistar machos adultas tratadas y testigos. Las primeras recibieron una dosis única de AFB de 10 μg/100 g de peso, disuelta en dimetilsulfóxido e inyectada por vía ip. Los testigos recibieron el solvente de AFB por la vía mencionada. Estudios previos (no publicados) permitieron establecer que dicha dosis subletal de AFB provoca un aumento significativo de la actividad sorbitol deshidrogenasa plasmática y cambios morfológicos hepatocelulares detectados por microscopía de luz. Los parámetros analizados incluyeron: flujo biliar, excreción biliar de sulfobromoftaleína (BSF) y sus conjugados y actividad glutatión-S-transferasa hepática. Los resultados obtenidos permitieron comprobar una disminución significativa del flujo biliar en las ratas tratadas en comparación con el observado en ratas testigos (3.77 μl/min/100 g de peso, ES ± 0.10, n = 7 y 2.20 μl/min/100 g de peso, ES ± 0.14, n = 12, respectivamente ($p < 0.01$). Por lo contrario la velocidad de excreción biliar de BSF en función del tiempo fue mayor en los primeros 10 min en los animales tratados y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Esto provocó una mayor excreción acumulativa inicial de BSF en función del tiempo en los animales tratados, aunque el porcentaje de recuperación de la dosis de BSF al cabo de 60 min de la inyección no mostró diferencias entre grupos (55.0 % ± 4.4, n = 4 y 51.0 % ± 5.6, n = 6, respectivamente). Los porcentajes de BSF conjugada presente en bilis fueron similares en testigos y tratados (80 %). Se observó una correlación positiva y significativa entre flujo biliar y velocidad de excreción biliar de BSF en ambos grupos. La extrapolación de ambas rectas a velocidad O de excreción biliar de BSF (estimativa del flujo biliar en ausencia del colorante) coincidió con el valor del flujo biliar basal determinado en cada grupo. No existió una diferencia significativa en la actividad glutatión-S-transferasa hepática en ambos grupos, expresada en mg BSF/5 min/mg de proteínas (testigos: 7.95 ± 0.77, n = 5 y tratadas: 8.72 ± 1.12, n = 6) ($p < 0.05$). Los resultados permiten sugerir que la AFB en la dosis estudiada produce una alteración del flujo biliar y de la excreción hepática de la BSF no afectando la conjugación de la misma. La mayor velocidad de excreción biliar inicial del colorante en los animales tratados, podría estar relacionada con el rápido aumento del flujo biliar producido por la BSF en estos animales.

56

Estudio de la secreción biliar en ratas alimentadas con dieta carente de proteínas

J. V. Rodríguez, Marta Dubin, J. Monti, R. Trbojevich, María C. Carrillo, E. A. Rodríguez Garay

Instituto de Fisiología Experimental, Facultad de Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional de Rosario

Existen aspectos contradictorios con respecto al efecto de la dieta aproteica sobre el flujo biliar (FB) y al rol que éste desempeña en la metabolización hepática de ciertos aniones orgánicos. En el presente

trabajo se determinó el FB, el flujo biliar independiente de sales biliares (FISB) y la composición de la bilis en ratas alimentadas con dieta normal y libre de proteínas, con el objeto de establecer el efecto de la carencia proteica sobre los citados parámetros. Se utilizaron ratas Wistar machos adultas alimentadas con una dieta sintética completa (DN) durante 3 semanas. Un grupo de ratas continuó siendo alimentada con DN y el otro con una dieta aproteica (DA) durante 7 días. Ambas dietas fueron isocalóricas y preparadas en nuestro laboratorio. En todos los animales se estudiaron los siguientes parámetros: peso corporal (PC), peso hígado (PH), (PH/PC) 100, proteínas totales hepáticas (PTH), glutatión hepático total (GSH), proteínas séricas totales (PTS) y albúmina sérica (AS). Se determinó también el FB, el FISB, la concentración de sales biliares en bilis (SB), la velocidad de excreción biliar de sales biliares (VSB), las concentraciones biliares de colesterol (CO) y fosfolípidos (FL) y la osmolaridad (Osm) de la bilis. Los datos están expresados en valores medios $\pm$ ES. Los resultados mostraron diferencias en el PC (DN : 282 g $\pm$ 5, n = 10 y DA : 261 g $\pm$ 6, n = 11) ($p < 0.005$) y en el PH (DN : 9.06 g $\pm$ 0.20, n = 10 y DA : 8.17 g $\pm$ 0.33, n = 11) ($p < 0.025$). Como consecuencia, la relación (PH/PC) 100 no mostró diferencias (DN : 3.22 $\pm$ 0.06, n = 10 y DA : 3.13 $\pm$ 0.09, n = 11). Se encontraron significativamente disminuidas las concentraciones de: PTH (mg/g hígado) DN : 191 $\pm$ 9, n = 10 y DA : 164 $\pm$ 8, n = 11) ($p < 0.025$), GSH (μmoles/g hígado) (DN : 5.60 $\pm$ 0.45, n = 5 y DA : 1.34 $\pm$ 0.14, n = 5) ($p < 0.001$), PTS (g/dl) (DN : 5.4 $\pm$ 0.1, n = 5 y DA : 4.5 $\pm$ 0.1, n = 5) ($p < 0.001$) y AS (g/dl) (DN : 2.9 $\pm$ 0.1, n = 5 y DA : 2.5 $\pm$ 0.1, n = 5) ($p < 0.005$). El FB (μl/min/g hígado) se encontró disminuido en los distintos períodos de tiempo estudiados: 15 min (DN : 1.47 $\pm$ 0.09, n = 8 y DA 1.09 $\pm$ 0.07, n = 10) ($p < 0.005$), 30 min (DN : 1.34 $\pm$ 0.06, n = 8 y DA 1.03 $\pm$ 0.06, n = 10) ($p < 0.005$) y 45 min (DN : 1.41 $\pm$ 0.07, n = 8 y DA 1.04 $\pm$ 0.07, n = 10) ($p < 0.005$). También se encontró disminuida la VSB (nmoles SB/min/g hígado a los 15 min (DN 38 $\pm$ 3, n = 7 y DA 27 $\pm$ 4, n = 10) ($p < 0.05$), 30 min (DN : 30 $\pm$ 3, n = 7 y DA 20 $\pm$ 2, n = 10) ($p < 0.01$) y 45 min (DN 29 $\pm$ 4, n = 7 y DA 19 $\pm$ 2, n = 10) ($p < 0.01$). No se observaron diferencias en las concentraciones de SB, CO, FL, ni tampoco de la Osm (mOsm/kg agua) (DN 275 $\pm$ 11, n = 5 y DA 257 $\pm$ 13, n = 5). Se encontró una disminución de la FISB (μl/min/g hígado) (DN = 1.26 y DA = 0.74) estimada por la correlación entre FB y la VSB extrapolando la recta de regresión a cero de VSB. Puede concluirse que por efecto de la administración de una dieta aproteica en ratas, se produce una disminución del PC, PH, PTH, GSH, PTS, AS, VSB y del FB a expensas de la fracción independiente de sales biliares.

57

Estado subclínico de malnutrición y alteraciones inmunológicas en colecistitis litiásica crónica (CLC)

Laura C. Giraudo Conesa, Alicia Stoliar, A. Vispo, Nora Iraola, C. Rubianes, H. Achával Ayerza

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional Medicina y Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires

Se investigó el estado de nutrición e inmunocompetencia en pacientes con CLC pertenecientes a una misma población hospitalaria, entre 40-50 años de edad, sometidos a colecistectomía. Sus análisis de rutina fueron normales. No presentaron otra patología ni sepsis; tampoco signos clínicos de malnutrición, evaluados según el peso corporal y albúmica sérica. No recibieron medicación desde 15 días antes de la operación. El aporte calórico postoperatorio (carbohidratos exclusivamente) fue de 400 cal en las primeras 24 h y de 800 cal/día hasta las 168 h subsiguientes. Los parámetros de nutrición e inmunidad se evaluaron en sangre periférica en: 1) el preoperatorio inmediato (muestra 1); 2 el postoperatorio 48 h (muestra 2); 3) ídem 168 h (muestra 3). La nutrición se evaluó mediante cuantificación de proteínas de rápido turnover: *a)* prealbúmina; *b)* proteína transportadora de retinol (RBP); *c)* proteína transportadora de tiroglobulina

(TBG). La inmunidad se evaluó cuantitativamente mediante: *a)* linfocitos T, con rosetas E totales y rosetas E tempranas; *b)* linfocitos B, mediante la detección de inmunoglobulinas (Ig) de membrana, rosetas con eritrocitos de ratón y rosetas levadura-complemento; c) células con actividad citotóxica anticuerpo-dependiente, mediante rosetas EA; *d)* Ig séricas: IgG, IgM e IgA; *e)* sistema complemento: C_3, C_4 y C_3 pro-activador. Para el estudio estadístico se usó el análisis de varianza (test de Barlettt y test de Duncan). Se aplicó también el test "t" de Student. Los promedios $\pm$ DS de cada una de las tres muestras revelaron: Parámetros de nutrición: *a)* prealbúmina: los promedios de 1), 2) y 3) (4.4 ± 1.5, 2.6 ± 0.8 y 2.7 ± 0.7 mg/dl) fueron inferiores a los valores normales (VN) (25 ± 15 mg/dl) ($p < 0.0005$); los datos de 2) y 3) son inferiores a los de 1) ($p < 0.05$); *b)* RBP: sólo el promedio de 2) (2.2 ± 0.9 mg/dl) fue menor al VN (4.5 ± 1.5 mg/dl) ($p < 0.05$); los promedios de RBP en 1) y 3) estaban en el límite inferior del VN; *c)* TBG: los datos obtenidos en cada muestra coincidieron con el VN (2.6 ± 1.6 mg/dl). Parámetros inmunológicos: los promedios de valores relativos (%) y absolutos/mm^3 $\pm$ DS de cada marcador de membrana fueron, en cada una de las tres muestras, inferiores a los respectivos VN para esa década de edad ($p <$ 0.001 a 0.01): rosetas E totales, 1): 24 ± 4 y 639 ± 434; 2): 33 ± 23 y 656 ± 584; 3): 22 ± 8 y 340 ± 130, (VN: 72 ± 9 y 1597 ± 524; rosetas E tempranas, 1): 18 ± 4 y 464 ± 292; 2): 20 ± 14 y 278 ± 181; 3): 8 ± 3 y 120 ± 23, (VN: 31 ± 13 y 651 ± 297); Ig membrana: 1): 13 ± 8 y 255 ± 120; 2): 18 ± 6 y 261 ± 127; 3): 13 ± 7 y 223 ± 132, (VN: 21 ± 4 y 437 ± 172); rosetas ratón: 1): 4 ± 4 y 135 ± 219; 2): 2 ± 1 y 27 ± 20; 3): 2 ± 0.5 y 27 ± 14, (VN: 8 ± 7 y 180 ± 140); rosetas levadura-complemento: 1): 2 ± 1 y 61 ± 45; 2): 5 ± 3 y 71 ± 34; 3): 4 ± 1 y 58 ± 35, (VN: 12 ± 9 y 275 ± 176). Los promedios correspondientes a rosetas EA estuvieron dentro del rango normal (VN: 11 ± 3 y 248 ± 127). Comparando los datos de 1) vs 2, 2) vs 3) y 1) vs 3), para cada marcador, se registró una disminución de rosetas E tempranas a las 168 h ($p < 0.001$); entre los otros marcadores no se registraron diferencias en función del tiempo. Respecto de las Ig séricas, en las muestras 1), el 80 y el 50 % de los pacientes presentaron aumento de la IgG e IgM, respectivamente; en las muestras 2), los valores de Ig disminuyeron a VN, aumentando nuevamente en las muestras 3). Los niveles de IgA coincidieron con VN. No se observó activación del complemento por vía clásica ni por vía alterna, estando el nivel de las fracciones estudiadas, dentro de límites normales. En conclusión, el grupo de pacientes con CLC estudiado, presentó manifestaciones subclínicas de malnutrición y alteraciones cuantitativas de las células inmunocompetentes.

58

Citotoxicidad de leucocitos humanos mononucleares de individuos normales y chagásicos contra epimastigotes de Trypanosoma cruzi

Rita L. Cardoni, María Teresa Rimoldi, María Marta E. de Bracco

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La finalidad de este trabajo fue determinar si los leucocitos mononucleares periféricos (LMP) participan en la destrucción de *T. cruzi*, y si existen diferencias en el comportamiento de LMP provenientes de individuos normales, con serología negativa para la enfermedad de Chagas, o de pacientes chagásicos crónicos. Para ello se determinó la capacidad citotóxica in vitro de LMP purificados por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque, contra formas de cultivo de *T. cruzi* marcadas con 3H-uridina (3H-*T. cruzi*). La determinación se realizó en medio 199 conteniendo 5 % de suero fetal bovino inactivado, solo, en presencia de suero de paciente chagásico o de antisuero de conejo anti-epimastigote de *T. cruzi* (Ac) en un volumen final de 0.2 ml. La capacidad citotóxica de los LMP se evaluó por el porcentaje de radiactividad liberada al sobrenadante luego de la incubación de 4×10^4, 3H-*T. cruzi* con LMP durante 3 h a 28° C, con o sin

el agregado de antisuero. Los datos se expresaron como $\bar{x} \pm$ ES, n : número de determinaciones. Los LMP normales, en una relación LMP: parásitos 50 : 1, produjeron poco efecto lítico en ausencia de Ac (5 $\pm$ 1, n : 26) o en presencia de una dilución 4×10^{-2} de suero de conejo normal (8 $\pm$ 2, n : 7), pero alcanzaron altos niveles de citotoxicidad en presencia de una dilución 4×10^{-2} de Ac (50 $\pm$ 2, n : 27). Los estudios cinéticos indican que luego de 3 h de incubación se alcanza aproximadamente la mitad del efecto lítico máximo. La capacidad citotóxica fue directamente proporcional a la concentración de Ac agregado, siendo de 9 $\pm$ 5, 15 $\pm$ 4, 30 $\pm$ 3, 41 $\pm$ 1, 51 $\pm$ 2, 57 $\pm$ 3 y 64 $\pm$ 2 (n : 5) para diluciones finales de Ac 4×10^{-7}, 4×10^{-6}, 4×10^{-5} 4×10^{-4}, 4×10^{-3}, 4×10^{-2} y 4×10^{-1}, respectivamente. Utilizando una dilución de Ac 4×10^{-2} los niveles de citotoxicidad aumentaron proporcionalmente a la relación LMP: 3H-*T. cruzi*-Ac, siendo de 2 $\pm$ 1, 9 $\pm$ 1, 22 $\pm$ 2, 35 $\pm$ 6, 46 $\pm$ 4, 55 $\pm$ 4 y 58 $\pm$ 2 (n : 7) para las relaciones 1 : 1 2 : 1, 5 : 1, 10 : 1, 50 : 1 y 100 : 1, respectivamente. La actividad citotóxica de los LMP se redujo considerablemente luego de la depleción de células adherentes sobre superficies de vidrio o por pasaje por columnas de nylon o Sephadex G-10; la disminuci4n de la capacidad citotóxica fue del 67 %, 81 % y 87 %, respectivamente. Los estudios morfológicos señalan que las células mononucleares adherentes son capaces de fagocitar epimastigotes. Los LMP provenientes de pacientes chagásicos crónicos mostraron un comportamiento similar a los LMP normales. Sólo en presencia de anticuerpo específico (suero autólogo) tuvieron actividad citotóxica importante (23 $\pm$ 5, n : 14), siendo de 6 $\pm$ 2 (n : 14) sin suero y 2 $\pm$ 1 (n : 3) para LMP normales con suero autólogo. En conclusión, las células mononucleares adherentes periféricas fagocitan y ejercen un efecto citotóxico sobre epimastigotes de *T. cruzi* en presencia del antisuero específico. En ausencia de antisuero, tanto los leucocitos mononucleares normales, como los provenientes de pacientes chagásicos crónicos, no producen un efecto detectable. Estos resultados indican que la citotoxicidad de los LMP contra *T. cruzi* constituye un probable mecanismo efector contra la infección, aunque no puede descartarse que si la velocidad de destrucción in vivo fuera lenta, pueda constituir un sistema de evasión del sistema de defensa del huésped por parte del parásito circulante.

59

Mecanismo de la fotoinactivación del virus Junin

MARIANA FERNÁNDEZ COBO, E. L. PASIAN, ZULEMA M. DE MARTÍNEZ SEGOVIA

Instituto Nacional de Microbiología Carlos G. Malbrán, Buenos Aires

Cuando el virus Junin proveniente de cerebro de ratón es sensibilizado con azul de metileno durante una noche en la oscuridad en condiciones de pH alcalino para facilitar la penetración del colorante y a una temperatura satisfactoria para retener la máxima antigenicidad (4° C) una exposición a la luz durante 30 minutos destruye la infectividad de dichas preparaciones. Sin embargo, la antigenicidad no resulta dañada, dado que la inoculación de estos preparados al cobayo los protege contra el desafío con virus vivo. Nos propusimos estudiar el mecanismo que opera en dicha inactivación. Para ello el virus Junin, cepa MC_2 se hizo crecer en monocapas de células BHK21 y el ácido nucleico se marcó con 3H-uridine y las proteínas con aminoácidos 14 C. Los fluidos infectados se concentraron por ultracentrifugación y se purificaron mediante gradiente de densidades de sacarosa. El RNA viral se extrajo de dichas preparaciones por el método del fenol. Los RNA virales solubilizados, se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 2.7 %. Se observó una drástica disminución en la eficiencia de extracción, la cual pasa de valores del 75 % para el virus control a sólo 15 % cuando el virus está inactivado. El RNA no extraído permaneció en la fase fenólica, conjuntamente con las proteínas desnaturalizadas. Cuando estos RNA son solubilizados, permanecen unidos a las proteínas en forma de complejo que no penetra en el gel. El RNA

solubilizado es solo parcialmente precipitado por alcohol y el perfil electroforético de este ácido nucleico indica que la inactivación fotodinámica ha provocado la degradación de los segmentos del genoma viral.

60

Propiedades fisicoquímicas de un factor morfogenético aislado de preparaciones de interferón humano de leucocitos

LILIA DAVEL, LYDIA PURICELLI, ELISA BAL DE KIER JOFFÉ, EUGENIA S. DE LUSTIG

Departamento de Investigaciones, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

En trabajos anteriores hemos podido aislar de preparaciones de interferón humano de leucocitos un factor que altera la morfología de algunas líneas celulares in vitro. Determinamos que el factor morfogenético (FM) aislado es un péptido de peso molecular cercano a los 6000, que no posee actividad antiviral, difiriendo además en sus propiedades fisicoquímicas. FM es resistente al tratamiento con tripsina, pH extremos y a tratamientos térmicos. El propósito de este trabajo es completar la caracterización fisicoquímica del FM. Debido a que el FM fue resistente a la tripsina, que es un enzima específico, se trató con otros enzimas proteolíticos: proteinasa-K (50 μg/50 μg FM, 1 h) y pronasa (12.5 μg/100 μg FM, 16 h). Su actividad fue resistente a ambos tratamientos. Hemos podido aislar el FM de preparaciones de interferón humano de leucocitos tratadas con diferentes inhibidores de proteasas (ácido ε - aminocaproico + EDTA, Trasylol). Por lo tanto creemos que el FM aislado no es un producto de degradación de las fracciones responsables de la actividad anti-viral. Por cromatografía líquida de alta presión se determinó su peso molecular en 6200. Para investigar si el FM podría tratarse de un glicopéptido realizamos una serie de reacciones específicas. El FM: 1) precipita con etanol 70 %; 2) no da precipitado con tricloroacético 0.5 M, ni con perclórico 0.75 M, ni con sulfosalicílico 0.2 M; 3) da positiva la reacción de fenol-sulfúrico para carbohidratos. En estas reacciones utilizamos como controles péptidos glucídicos y no glucídicos. Hemos efectuado electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % y al 15 % en tubo y en placa, en presencia o no de SDS y β mercaptoetanol. En condiciones reductoras se obtiene una sola banda que se tiñe con azul de Coomassie y PAS. Estos datos nos permiten concluir que el FM aislado de preparaciones de interferón humano de leucocitos es un glicopéptido monomérico, de 6200 daltons, resistente a la acción de enzimas proteolíticas.

61

Papel de las enzimas lisosomales de leucocitos polimorfonucleares humanos en la destrucción de epimastigotes de Trypanosoma cruzi

E. DE TITTO, RITA L. CARDONI

CEFAPRIN, (CONICET) e Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Los leucocitos periféricos humanos polimorfonucleares (PMN) fagocitan y destruyen a epimastigotes de *T. cruzi* sensibilizados (*T. cruzi*-Ac). El objetivo de este trabajo fue determinar la participación de las enzimas lisosomales de PMN en dicha destrucción. Para ello 2.5 × 10^6 PMN fueron incubados con epimastigotes de *T. cruzi*, con o sin el agregado de suero inactivado de un paciente chagásico crónico (Ac), en un volumen final de 0.5 ml. Luego de la incubación se centrifugaron los tubos de reacción y se determinó la actividad de β-glucuronidasa y lisozima en los sobrenadantes libres de células. La viabilidad de los PMN durante la reacción fue determinada por la medida de la liberación de láctico-deshidrogenasa citoplasmática (LDH). La actividad de β-glucuronidasa se determinó en base a la velocidad de liberación de fenolftaleína del complejo β-glucuronidato-fenolftaleína; la actividad de lisozima por la velocidad de lisis de una suspensión bacteriana, y la actividad de LDH por la velocidad del pasaje de lactato a piruvato. La liberación de enzimas se expresó como el porcentaje

de actividad enzimática en los sobrenadantes en relación a la actividad total en 2.5×10^6 PMN lisados en 0.5 ml de Tritón X-100 0.4 %. Se realizó la observación microscópica de extendidos coloreados con May Grünwald Giemsa realizados con los sedimentos de la reacción para determinar la proporción de células involucradas en la fagocitosis del parásito. Además se realizó el ensayo de citotoxicidad con parásitos tratados en forma similar pero marcados con 3H-uridina. Se observó que los PMN liberaban enzimas lisosomales luego de la interacción con *T. cruzi*-Ac (15 % de β-glucuronidasa y 46 % de lisozima), pero que los niveles de liberación eran muy bajos en ausencia de Ac (6 % de β-glucuronidasa y 24 % de lisozima) o en presencia de suero humano normal, luego de 3 h de incubación con una relación PMN: parásitos 1 : 1. En estas condiciones, el porcentaje de células que fagocitan *T. cruzi* no sensibilizados es del 10 %, y *T. cruzi*-Ac del 60 %. Los porcentajes de citotoxicidad con una relación PMN: *T. cruzi* 10 : 1, son de 74 ± 5 (n : 10) con Ac, y de 8 ± 4 (n : 10) en ausencia de Ac, luego de 3 h de incubación a 28° C. La liberación de enzimas lisosomales de PMN en presencia de *T. cruzi*-Ac, en una relación 1 : 1, aumentaba al incrementar la concentración de Ac hasta 1/50, y el tiempo de incubación hasta 3 h. La liberación de enzimas lisosomales ocurre normalmente en presencia de CNK 2 mM y N_3Na 2 μM, inhibidores de la citotoxicidad contra *T. cruzi*-Ac en un 54 % y 65 %, respectivamente, pero que no afectan la fagocitosis del parásito. Por otro lado, hay incremento en la liberación de enzimas lisosomales en presencia de 10 μg/ml de citocalasina B, a pesar de estar inhibida la fagocitosis y la citotoxicidad de PMN contra *T. cruzi*-Ac. No hay lisis de epimastigotes no sensibilizados marcados con 3H-uridina durante la interacción PMN: *T. cruzi*-Ac, que produce liberación de enzimas lisosomales, indicando que en estas condiciones las enzimas liberadas no afectan la integridad del parásito. Estos resultados indican que las enzimas lisosomales no juegan un papel predominante en la muerte de *T. cruzi*-Ac por PMN normales. Sin embargo, los estudios cinéticos muestran una estrecha correlación entre la fagocitosis de *T. cruzi*-Ac y la liberación de enzimas lisosomales (r : 0.95 para lisozima y r : 0.88 para β-glucuronidasa), lo cual sugiere que dichas enzimas intervienen en la degradación intracelular de los parásitos.

62

Efecto de factores esplénicos sobre el crecimiento tumoral

Sara Oiscold-Dagá, María Adela Jasnis

Laboratorio de Inmunobiología, Instituto de Oncología, Universidad de Buenos Aires

Anteriormente observamos que las células de bazo de un portador de tumor singeneico, S13 (diám 10 mm), eran capaces de exaltar el crecimiento tumoral en un test de neutralización in vivo. Quisimos probar si las células esplénicas también podían ejercer su actividad exaltadora vía productos solubles y si se observaba alguna modificación de dicha actividad después de la cirugía de un tumor de 7-10 días de evolución. Para ello investigamos los efectos in vivo de sobrenadantes de cultivo de 24 h de células de bazo (SoB) de ratones BALB/c portadores y exportadores de tumor, por su capacidad de modificar el crecimiento tumoral. Se cultivaron células esplénicas de: *a)* portadores de tumor; *b)* ratones a los cuales se les extirpó el tumor 1, 6, 9, 13 y 20 días antes, y *c)* ratones normales. Al día 20 post-cirugía, un grupo de animales presentó recidivas locales, estudiándose sus bazos por separado. Se inyectaron sc 0.05 ml de los distintos SoB en la almohadilla plantar de receptores normales singeneicos. El mismo volumen de medio completo se inyectó en el grupo control. A las 24 h los ratones recibieron en la misma almohadilla 3×10^4 células tumorales. Cada grupo experimental y control consistió de 10 animales. El desarrollo tumoral se evaluó diariamente durante 20 días, aproximadamente. Observamos que el SoB de portadores de tumor facilitaba significativamente ($p << 0.001$) el crecimiento tumoral respecto al control. Esta actividad exaltadora también se manifestó sobre otros

tumores singeneicos (M2 y M3). Los SoB normales no ejercieron efecto sobre el crecimiento tumoral ($p < 0.2$). Los SoB obtenidos 13, 9, 6 y 1 día después de la cirugía no tuvieron efecto exaltador significativo ($p < 0.2$, $p < 0.3$, $p < 0.4$, $p < 0.5$, respectivamente), sobre el crecimiento tumoral. Tampoco se observó exaltación con los SoB de los exportadores de 20 días no recidivados ($p < 0.3$) mientras que los SoB de recidivados indujeron un efecto facilitador del crecimiento tumoral ($p < 0.05$). En conclusión, los SoB de todos los grupos de animales operados, incluyendo los no recidivados al día 20, no indujeron exaltación del crecimiento tumoral, mientras que los SoB de portadores de tumor y de exportadores con recidivas al día 20 facilitaron el crecimiento tumoral. Parecería que un factor o factores inmunorreguladores no específicos, facilitadores del crecimiento tumoral, aparecen en el portador de tumor como resultado de su interacción con el tejido neoplásico, y que dichos factores desaparecerían o disminuirían hasta niveles insuficientes para desencadenar el mecanismo de exaltación, tan pronto como 24 h después de la extirpación quirúrgica del tumor.

63

Reconocimiento de un antígeno tumoral específico a través de la inducción de interferón γ en ratón

Silvia S. de Kohan, Bethy A. de Holstein

Instituto de Oncología Angel H. Roffo e Instituto de Microbiología Carlos Malbrán, Buenos Aires

Los interferones (IFNs) son considerados una familia de glicoproteínas con actividad antiviral e inmunoreguladora. Siendo el IFN γ una linfokina producida como respuesta inmune específica o por diferentes mitógenos (Con A). En nuestro modelo experimental (tumor de mama en ratón C_3H) nos propusimos estudiar: 1) La producción in vitro de interferón γ por el antígeno específico tumoral. 2) Determinar los niveles de producción durante la evolución del tumor. Se utilizan ratones C_3H de 6-8 semanas, portadores de tumor de mama singeneico. Se preparan cultivos de células esplénicas de: *a*) portadores de tumor (2 a 30 días de evolución) y *b)* ratones normales. Se cultivan 1×10^7 células esplénicas/ml en medio RPMI, adicionado de suero fetal bovino y glutamina, en presencia del antígeno tumoral específico y *b)* ratones normales. Se cultivan 1×10^7 células esplénicas/ml en medio RPMI, adicionado de suero fetal bovino y glutamina, en presencia del antígeno tumoral específico y teniendo como control un antígeno alogeneico (Sarcoma 13 en ratones BALB) y un mitógeno de linfocitos T (Con A). Los antígenos fueron preparados en el laboratorio y valorado su contenido proteico para normatizar la dosis de trabajo que resultó equivalente a 75 γ proteína/ml, dosis capaz de producir una hipersensibilidad retardada positiva en el mismo huésped. En los sobrenadantes de los cultivos (24-72 h a 37° C) se determina la presencia de interferón por su característica actividad antiviral, en técnica de microplaca con células L de ratón frente a virus de estomatitis vesicular Su caracterización como IFN γ se basa en su labilidad a pH ácido. Los resultados obtenidos nos indican que: hay inducción de interferón por el antígeno tumoral específico en los cultivos provenientes de portadores de 2-14 días mientras no se detecta en los correspondientes a más de 20 días de portación. Su caracterización corresponde a interferón γ. Los niveles no superan la dilución 1 : 10; pero son reproducibles y similares a los obtenidos por inducción con Con A. Los controles de animales normales son siempre negativos. Se destaca también la negatividad de respuesta frente al antígeno alogeneico. Estos datos corresponde al promedio de 3 experiencias y cada ensayo es un cultivo promedio de 5 ratones. En conclusión, los cultivos de células esplénicas de los portadores de tumor de mama en ratón C_3H, reconocen al antígeno específico en una etapa muy temprana de la evolución del tumor, constatado a través de la inducción de IFN γ in vitro.

64

Relación entre histocompatibilidad y producción de interferón γ en cultivos mixtos linfocitarios humanos

E. HAAS, L. M. KNECHER, C. INGLESINI, L. VERRUNO, I. PIROSKY

Laboratorio de Inmunogenética, Sanatorio Güemes y Laboratorio Inmunoquemia, Buenos Aires

Se sabe que los linfocitos activados producen interferón. En el caso de la estimulación alogénica de linfocito humano nos preguntamos si tal producción de IFN (Interferón) sería proporcional a las diferencias entre las dotaciones aloantigénicas de las células involucradas. Se realizaron cultivos mixtos unidireccionales de linfocitos humanos, irradiando alternativamente cada uno de los componentes del par, durante 4 días en familias elegidas. Se tipificó a los pacientes involucrados para ABO, Rh, HLA-A, B y C. Se determinó los alelos de los sistemas GLO y C_3. Se dosó Interferón α en cada combinación celular binaria. A los fines del análisis de los datos, se dividió a los pares involucrados en histoidénticos, hemicompatibles e incompatibles. Se centró la evaluación de lo sucedido en cada par, relacionando las diferencias HLA-D (cpm por incorporación de TH_3) con la cantidad de IFN producido. En cuanto a los resultados: *a*) En los pares histoidénticos la producción de IFN fue de 4 a 10 en ambas direcciones. *b)* En aquellos hemicompatibles tal producción osciló entre 10 y 32 en ambas direcciones. *c)* En los pares constituidos por sujetos incompatibles los valores de IFN tienden a ser mayores, presentando una amplia dispersión, en ambas direcciones. *d)* Se vio que no es mensurable (nula) la producción de IFN por los cultivos autólogos. *e)* La concordancia entre HLA-D y producción de IFN - γ es del 75 %, aproximadamente. En conclusión, 1) los valores de IFN obtenidos parecen depender del par celular involucrado independientemente de la dirección de la activación alogénica; 2) el hecho de que haya alguna producción de IFN en los pares hiestoidénticos y ninguna en los cultivos autólogos, indica que el HLA es quizá la diferencia antigénica más importante pero no la única, en la activación del mecanismo productor de interferón en los MLC.

65

Exaltación de metástasis por antígeno específico en tumores de mama murinos

SLOBODANKA KLEIN, YOLANDA P. DE BONAPARTE, ISABEL D'ELÍA, L. L. COLOMBO

Instituto de Oncología A. H. Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Se estudiaron dos tumores de mama murinos de distinta inmunogenicidad y capacidad de metastatizar en pulmón (M_2 y M_3). La extirpación quirúrgica del tumor en período precoz de su evolución (10 días) y posterior desafío con célulares tumorales (CT) resultó en una resistencia al crecimiento tumoral en el 100 % de los exportadores de tumor M_2, y en la exaltación del crecimiento del nuevo inóculo tumoral en el 100 % de los exportadores de tumor M_3. La capacidad de metastatizar en pulmón es del 20 % en los portadores del tumor M_2 al final de la evolución del tumor (30 días) y del 60 % en los portadores de M_3 (a los 45 días). En el presente trabajo se estudia la influencia del antígeno tumoral específico sobre el crecimiento de las metástasis en ambos tumores. Ratones BALB/c portadores de tumor M_2 y M_3 de 10 días de evolución fueron operados de su tumor primario y divididos en los siguientes grupos: *a)* inoculados con CT del mismo tumor; *b)* inoculados con extracto tumoral específico (ETE) (dos dosis de 100 μg con intervalo de 3 días); *c)* sin tratamiento; *d)* normales falsamente operados e inoculados con igual número de CT que el grupo *a*). La suspensión de CT se preparó por dispersión enzimática. El ETE se obtuvo por homogeinización del tejido tumoral en PBS determinándose la concentración proteica por el método de Lowry. Los grupos fueron sacrificados 40 d post-cirugía con los siguientes resultados: 1) en exportadores de tumor M_3 el número de ratones con metástasis pulmonares/total de ratones fue para el grupo *a*) 12/20 (60 %); para el

grupo *b*) 17/27 (61 %); para el grupo *c*) 5/17 (28 %) con $p < 0.03$ respecto de los grupos *a*) y *b*); para el grupo *d*) 3/17 (12 %). 2) en exportadores de M_2 el número de ratones con metástasis pulmonares/total de ratones fue para el grupo *a*) 3/9 (33 %); para el grupo *b*) 8/8 (88 %); para el grupo *c*) 2/8 (25 %) con $p < 0.0008$ respecto del grupo *b*); para el grupo *d*) 0/8. La cirugía precoz del tumor M_3 que metastatiza en el 60% de los animales reduce la incidencia de metástasis al 28 %, pero cuando se tratan con ETE o con CT aumenta la capacidad de metástasis. Por otro lado con el tumor M_2 que sólo metastatiza en el 20 % de los animales, la inoculación de ETE, pero no la de CT aumenta significativamente esta incidencia. Es decir, en dos tumores de distinto potencial metastásico y diferente inmunogenicidad, la inoculación de ETE aumenta la incidencia de metástasis pulmonares. Dado que la inoculación de CT sólo produjo aumento de metástasis en el modelo M_3, una interpretación de estos resultados sería que las células del tumor M_3 liberen más antígeno a la circulación que las del tumor M_2. En consecuencia, la capacidad de liberar antígeno sería una de las responsables del diferente potencial metastásico e inmunogenicidad de ambos tumores.

66

Actividad angiogénica en tumores mamarios murinos y en sus metástasis

MARTA M. MIGUEZ, LILIA DAVEL, EUGENIA S. DE LUSTIG

Departamento de Investigación, Instituto de Oncología A. H. Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El desarrollo de los tumores sólidos comprende dos estadíos: uno avascular, de crecimiento lento en el que se alcanza un diámetro no mayor de 2 mm y un estadío vascular, caracterizado por la penetración de vasos sanguíneos desde los tejidos vecinos y por un crecimiento exponencial de la masa tumoral. Los tumores promueven la proliferación capilar mediante la liberación del factor angiogénico tumoral (TAF), que actúa específicamente sobre el endotelio de los vasos sanguíneos. Ya que la aparición de la vascularización facilita la invasión tumoral y las metástasis, tratamos de establecer la presencia de actividad angiogénica en un adenocarcinoma mamario murino singeneico en cepa BALB/c espontáneo transplantable y de mediana capacidad metastásica en pulmón (M_3) y en una variante obtenida experimentalmente, con alta incidencia de metástasis pulmonares (MM_3). Se estudió si los explantos provenientes de los tumores subcutáneos (sc) y las metástasis pulmonares respectivas (p), presentaban actividad angiogénica sobre membrana corioalantoidea de embrión de pollo (MCA). La prueba en MCA es cualitativa y se considera que existe actividad angiogénica cuando se observa aumento de la vascularización en el 50 % de los embriones ensayados. Los resultados obtenidos, expresados como el número de MCA con actividad angiogénica/total, fueron: M_3-sc : 6/6 (100 %), M_3-p : 5/6 (83 %), MM_3-sc : 4/5 (80 %), MM_3-p : 6/6 (100 %). Se aisló además el factor a partir del tumor M_3-sc, con una modificación del método de Folkman. Se preparó una suspensión celular, que fue sometida a hipotonía y separada por centrifugación en dos fracciones: nuclear y citoplasmática, encontrándose actividad angiogénica en ambas. Se sometió a la fracción citoplasmática a ultracentrifugación. El precipitado se deslipidizó, se dializó y luego se fraccionó en columna de Sephadex G-100, obteniéndose un PM aproximado de 90 000. Para establecer si en nuestro modelo experimental las células tumorales en cultivo conservan la capacidad angiogénica, se realizaron cultivos de los distintos tumores y se aisló el TAF reemplazando el medio de cultivo por solución de Ringer-Lactato, hacia la cual difunde el factor. Dicha solución fue dializada y liofilizada y la prueba sobre MCA dio resultados positivos en todos los casos, comprobándose así que se mantiene la capacidad vascularizante después de sucesivos repiques. Se concluye que los tumores subcutáneos y las metástasis respectivas producen un factor angiogénico que hemos podido aislar tanto del tumor entero como de las células tumorales en cultivo. El PM

del TAF aislado en este modelo concuerda con el hallado por otros autores.

67

Orquitis inducida en ratas por experimentos de transferencia adoptiva

LIVIA LUSTIG, L. M. SATZ, BERTA DENDUCHIS

Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

En trabajos previos hemos demostrado que la inyección intravenosa de un suero heterólogo anti-membrana basal induce, en ratas Wistar, una orquitis multifocal. La orquitis se caracteriza por la presencia de leves infiltrados a predominio de células mononucleares en el intersticio, lesiones del epitelio germinal con distintos grados de descamación celular y alteraciones de la pared del túbulo seminífero y de la membrana basal, sitio de la reacción antígeno-anticuerpo. El antígeno utilizado para la obtención del antisuero es una fracción soluble, no colágena, de la membrana basal del túbulo seminífero (D-STBM). Aun cuando en este cuadro, el primer ataque inmunológico, tisular, es llevado a cabo por los anticuerpos específicos, se desarrolla además una respuesta de inmunidad celular a antígenos de membrana basal. A efectos de demostrar si en este cuadro de orquitis experimental, las células linfáticas *per se* son capaces, a su vez, de desencadenar lesiones testiculares, se realizaron experimentos de transferencia adoptiva. Un lote de 8 ratas Wistar, macho, adultas, provenientes de una colonia cerrada, fue inyectado con células infáticas del bazo de ratas (de la misma cepa y colonia), a las cuales se les había inducido una orquitis multifocal por la inyección, 30 días antes, de un suero anti-D-STBM. Un lote control de 10 ratas fue inyectado con células linfáticas provenientes de ratas inyectadas, 30 días antes, con un suero normal de conejo. En todos los casos, las células linfáticas fueron inyectadas, por vía intravenosa, en concentraciones de 1.5-4 $\times$ 10^8 células, en un volumen no superior a 1 ml. Los animales fueron sacrificados a los 15 días de la transferencia de células y se estudió la histología del testículo y la respuesta de inmunidad celular frente a antígenos de membrana basal, por la técnica de inhibición de la migración leucocitaria (LMIR). Los resultados indican que el 75 % de los animales del lote experimental, desarrollaron lesiones testiculares focales similares al cuadro de orquitis de los dadores, mientras que ninguna de las ratas del lote control presentó lesiones. A su vez, los resultados del test LMIR, indicaron que sólo las células linfáticas de los animales del lote experimental, reaccionaron positivamente frente a antígenos de membrana basal. A pesar de la diferencia neta obtenida entre la respuesta del grupo experimental con respecto a la del grupo control, un experimento similar con ratas Wistar endocriadas, está en curso. En conclusión, se demuestra que las células linfáticas de ratas portadoras de una orquitis desencadenada por un suero anti-membrana basal, son capaces de inducir, en un receptor sano, lesiones testiculares.

68

Relación entre receptores para eritrocitos de ratón e inmunoglobulinas de membrana en linfocitos humanos normales y leucémicos

ALICIA STOLIAR, LAURA C. GIRAUDO CONESA, G. ASTALDI

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires y The Blood Research Foundation Center, Pavía, Italia

Con el fin de investigar la relación entre receptores para eritrocitos de ratón (MRBC) e inmunoglobulinas de membrana (m-Ig), se estudió la formación de rosetas entre linfocitos periféricos y MRBC en 10 sujetos hematológicamente sanos, de 50-70 años, y en 14 pacientes con leucemia linfática crónica tipo B (B-LLC) bajo corticoideoterapia. Los pacientes fueron divididos en dos grupos, según su leucocitosis: A) hasta 10 000/mm^3, y B) entre 10 000-60 000/mm^3 (valores basales). En cada caso se hicieron 3 tipos de experimentos, todos ellos por triplicado: 1) formación de

rosetas MRBC; 2) incubación de los linfocitos con antisueros anti-Ig humanas totales y monoespecíficos IgM, IgG, IgD, y posterior formación de rosetas MRBC; 3) cuantificación de células con m-Ig con antisueros fluorescentes anti-Ig humanas totales y monoespecíficos IgM, IgG o IgD. Como control del punto 2) se repitieron los estudios de inmunofluorescencia previa incubación de los linfocitos con los respectivos antisueros sin marca fluorescente. Los resultados se expresan, respectivamente, en promedios de valores relativos (%) y absolutos/mm^3 $\pm$ DS en normales y en los pacientes del grupo A; en los enfermos del grupo B, se consideran sólo los valores relativos, debido a la dispersión y alta leucocitosis. Los valores obtenidos y las diferencias estadísticas encontradas entre los promedios de rosetas MRBC del Exp 1) y los obtenidos en el Exp 2), fueron los siguientes: Normales: 1) Rosetas MSBC: 8 $\pm$ 2 y 184 $\pm$ 75; 2) Rosetas MRBC previa incubación con anti-Ig totales: 6 $\pm$ 3 y 143 $\pm$ 68 (ns); anti-IgM: 7 $\pm$ 2 y 150 $\pm$ 54 (ns); anti-IgG: 7 $\pm$ 3 y 153 $\pm$ 75 (ns); anti-IgD: 3 $\pm$ 2 y 56 $\pm$ 44 ($p < 0.001$). Por lo tanto, la incubación con antisuero anti-IgD produjo una inhibición máxima en la formación de rosetas MRBC (70 %). B-LLC: 1) Rosetas MRBC, grupo A: 33 $\pm$ 23 y 2108 $\pm$ 1920; grupo B: 9 $\pm$ 5; 2) Rosetas MRBC previa incubación con: anti-Ig totales: grupo A: 8 $\pm$ 7 y 399 $\pm$ 425 ($p < 0.05$); grupo B: 3 $\pm$ 2 ($p < 0.01$); anti-Ig M: grupo A: 7 $\pm$ 8 y 337 $\pm$ 452 ($p < 0.05$); grupo B: 4 $\pm$ 3 (ns); anti-IgG: grupo A: 10 $\pm$ 7 y 542 $\pm$ 567 (ns); grupo B: 4 $\pm$ 4 (ns); anti-IgD: grupo A: 11 $\pm$ 8 y 629 $\pm$ 630 (ns); grupo B: 3 $\pm$ 4 ($p < 0.02$). La máxima inhibición en la formación de rosetas MRBC fue observada en ambos grupos de pacientes con anti-Ig totales (70 y 75 %), y, además, con anti-IgM en el grupo A (79 %) y con anti-IgD, en el grupo B (70 %). Los experimentos de control demostraron que el pretratamiento de los linfocitos con los antisueros correspondientes, producían una inhibición del 90-100 % de las células m-Ig fluorescentes. En conclusión, la presencia de moléculas de m-Ig en linfocitos humanos periféricos parece necesaria para la formación óptima de rosetas MRBC. Se postula que el receptor MRBC estaría más estrechamente relacionado con la m-IgD en normales y en B-LLC con leucocitosis superiores a 10 000/mm^3, mientras que, en B-LLC con leucocitosis inferiores a 10 000/mm^3, el receptor MRBC estaría más relacionado con la m-IgM.

69

Infección crónica por Trypanosoma cruzi *en el* Cebus sp *adulto*

N. J. BOLOMO, J. MILEI, P. COSSIO, C. NAGLE, R ARANA, C. E. DEL PRADO, ELSA SEGURA

Instituto de Cardiología, Fundación H. Pombo de Rodríguez, CEMIC, ILAIMUS, INDIECH

De acuerdo a distintos estudios previos acerca de la patogenia de la miocarditis chagásica crónica se postula que un mecanismo inmunopatológico de daño tisular podría vincularse con los hallazgos clínicos y experimentales de la misma. En 1980 hemos descripto que el *Cebus sp* prepúber puede desarrollar algunas de las características de la enfermedad de Chagas, como xenodiagnóstico positivo postinfección, anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* y antimiocardio, trastornos electrocardiográficos fijos e inducidos por la ajmalina y alteraciones anatomopatológicas de importancia al año de la infección. A fin de comparar el comportamiento de la infección experimental en un grupo de animales adultos se infectaron 8 animales mayores de 3 años pertenecientes a una colonia de primates, por vía conjuntival con 4 $\times$ 10^4 formas metacíclicas infectantes de la cepa CAI. Se controlaron con xenodiagnósticos que se positivizaron ya a los diez días postinfección y se mantuvieron positivos hasta un año después en 4 monos y negativos en 6 monos a los 2 años, recordando en cierto modo a los patrones de parasitemia de la infección crónica humana. La curva de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* alcanzó los máximos valores a los 30 días: 3 monos con títulos de 1/256; 3 monos con títulos de 1/128 y 2 con títulos de 1/64. A los 210 días iniciaron el descenso para llegar a los 600 días con títulos de 1/64 en 4 monos, un mono con título 1/16 y

uno con título de 1/8; todos desarrollaron anticuerpos antimiocardio. Estos resultados muestran que la técnica de inmunofluorescencia perdería sensibilidad para detectar infección crónica en esta especie. No se observaron alteraciones electrocardiográficas espontáneas o inducidas. Un animal murió imprevistamente sin presentar lesiones imputables a la enfermedad de Chagas. No se hallaron signos anatomopatológicos de miocarditis chagásica en 6 animales que fueron sacrificados entre 700 y 800 días postinfección. Estos resultados muestran un diferente comportamiento del *Cebus sp* prepúber y adulto frente a una infección crónica con *Trypanosoma cruzi.*

70

Estudio de parámetros inmunológicos en ratones adultos infectados con virus Junin

Hebe A. Barrios, Silvia N. Rondinone, Jorgelina L. Blejer, O. A. Giovanniello, Nora R. Nota

Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Como ya es ampliamente conocido la susceptibilidad y/o resistencia del ratón a la infección intracerebral (ic) con virus Junin (VJ) está estrechamente relacionada con la edad. Mientras en el ratón de 24-48 horas de vida produce una mortalidad del 90-100 % en el ratón adulto (45 días de vida) inoculado con la misma dosis y por igual vía, la mortalidad es sólo del 8-10 %. Trabajos anteriores realizados en el ratón adulto infectado con VJ han permitido conocer algunos aspectos del problema. La administración de inmunosupresores como ciclofosfamida y suero antitimocito disminuyen la resistencia a la infección, la que puede ser, en este modelo, parcialmente restablecida por la transferencia de células esplénicas sensibilizadas o de anticuerpos específicos. Este trabajo tiene por objeto analizar los diferentes componentes que intervienen en la respuesta inmune que conducen a la resistencia del ratón adulto al VJ, tales como producción de células T citotóxicas (Tc) en bazo, desarrollo de hipersensibilidad retardada (células Td) y cinética y localización de anticuerpos circulantes en animales infectados con 1000 DL_{50} de la cepa XJ por vía ic. En lo que se refiere a componentes de la inmunidad celular se demostró que es posible detectar células efectoras Tc en el bazo de los animales infectados con VJ, valoradas por el ensayo de citotoxicidad por liberación de Cr51. La actividad citotóxica de las células se hizo evidente desde los 2 días postinfección (pi), con un índice citotóxico (IC) de 23.4 %, alcanzando el pico máximo a los 6 días pi (IC = 69.9 %), para luego disminuir progresivamente a valores del 20 % en el día 10 pi. No pudo ponerse de manifiesto reacciones de hipersensibilidad retardada al virus medida por el test de hinchazón en la pata de animales infectados por diferentes vías (intravenosa, intraplantar, intracerebral o intraperitoneal) y desencadenados a los 7 o 14 días pi. En cuanto a la respuesta humoral se caracterizaron los anticuerpos neutralizantes (Nt), fijadores de complemento (Fc) y fluorescentes (Fl). Se estudió su cinética de aparición y su ubicación en distintas fracciones séricas por pasaje en columnas cromatográficas con Sephadex G-200. Se observó que los anticuerpos aparecen más tardíamente que las células Tc y alcanzan sus títulos máximos a los 12 días pi para los Fc (1 : 64) y 20 pi para los Nt y Fl (1 : 160 y 1 : 80, respectivamente). Se observó que los anticuerpos Nt y Fl predominan en la fracción IgG mientras que los Fc en la fracción IgM. En las muestras tomadas para estudios virológicos (desde el día 2 pi hasta el día 20 pi) no se detectó virus en cerebro. Dado que se atribuye a las células Tc función de eliminación de virus, en nuestras experiencias se postula que ellas podrían ser las responsables tempranas de la carencia de virus en cerebro y que la posterior aparición de los anticuerpos contribuiría a la eliminación del virus residual. Se discuten las posibles interpretaciones de estos resultados.

71

Estudio patológico e inmunoenzimático de ratas inoculadas con virus Junin: acción de la ciclofosfamida

E. F. Lascano, Jorgelina L. Blejer, Nora V. Galassi, Marta R. Nejamkis

Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

En ratas Wistar, inoculadas intracerebralmente a los dos días de edad con 1000 DL_{50} de virus Junin, cepa $XJCl_3$ se observó una mortalidad del 100 % (50 % a los 15 días) que se redujo al 64 % (50 % a los 21 días) cuando eran tratadas con ciclofosfamida (dosis de 15 mg/kg de peso, en los días 2, 5 y 8 pi del virus). El estudio de la cinética viral no mostró diferencias entre ambos grupos experimentales, alcanzando valores de 6 log a los 9 días pi. Sólo fue posible detectar anticuerpos neutralizantes en el grupo tratado con ciclofosfamida, ya que los animales del otro grupo morían antes del momento de aparición de los anticuerpos. El objeto del presente trabajo fue comparar los resultados virológicos con estudios anatomopatológicos e inmunoenzimáticos. Veinte ratas de cada grupo fueron sacrificadas a los 9 días pi. Un hemiencéfalo de cada rata fue empleado para recuperación de virus y el otro para estudio morfológico e inmunocitoquímico. Se operó de tal manera que los datos virológicos y estructurales pudieran ser comparados, animal por animal. Los cortes fueron procesados para hematoxilina-eosina y para marcación del antígeno Junin con el método peroxidasa/antiperoxidasa (PAP). En ambos lotes de ratas, se observó distribución y concentración muy similar del antígeno Junin en las neuronas y astrocitos del sistema nervioso central, lo que coincidió con títulos infectivos semejantes. El antígeno estaba masivamente presente en la corteza cerebral y cerebelosa, en la capa piramidal del hipocampo, en los núcleos centrales, en la protuberancia y en el bulbo. Una diferencia neta entre ambos grupos experimentales fue señalada por el estudio histológico: el 65 % de las ratas sometidas únicamente a infección viral presentaban extensos y evidentes focos de necrosis del tejido nervioso, particularmente de la corteza cerebral. En esos focos, las células nerviosas eran reemplazadas por linfocitos, macrófagos y polinucleares neutrófilos. En las ratas infectadas y tratadas con ciclofosfamida, sólo el 15 % de los animales presentaba necrosis, la cual era siempre discreta y de mucha menor extensión que la del otro grupo. En ambos lotes experimentales se veía, además, meningitis, ocasionales focos de reblandecimiento de las radiaciones del cuerpo calloso, necrosis de la corteza cerebelosa, escasa congestión y mínimo exudado linfomonocitario perivascular en las áreas no necróticas. Del presente trabajo se concluye que el mecanismo inmunopatológico inducido por la inoculación intracerebral de ratas de dos días de edad con la cepa $XJCl_3$, disminuye por el tratamiento con el inmunosupresor sin que se altere la multiplicación viral.

72

Marcadores inmunológicos de atenuación de cepas vacunantes para Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA)

Jorgelina L. Blejer, Nora V. Galassi, Marta R. Nejamkis, Nora R. Nota

Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Este trabajo presenta los resultados de una serie de estudios conducentes a establecer marcadores biológicos de atenuación en cepas virales con posibilidades de ser empleadas como antígeno vacunante para la FHA. El parámetro que se usó fue el comportamiento de la respuesta inmune del cobayo hacia antígenos no relacionados. Se emplearon cobayos de 300-400 g de peso los que fueron inoculados por vía intramuscular con 1000 DL_{50} de cada uno de los virus empleados. Se utilizaron la cepa prototipo patógena XJ de virus Junin (100 % de mortalidad), las atenuadas $XJCl_3$ (20 % de mortalidad) y XJ_0 (18 % de mortalidad) y el virus Tacaribe (0 % mortalidad). En diferentes grupos experimentales inoculados con los virus mencionados se estudió título de virus en: sangre, bazo y ganglios; anticuerpos neutralizantes, recuento y fórmula de elementos sanguíneos y niveles de complemento sérico. Se investigó la influencia que la infección viral con los distintos virus producía sobre: 1) Hipersensibilidad humoral (HH) va-

lorada por el fenómeno de Arthus, utilizando como antígeno sensibilizante ovoalbúmina (OA). La infección con la cepa XJ produjo un efecto supresor en la respuesta humoral indicada por una baja concentración de anticuerpos precipitantes. Esta disminución en el título de anti-OA, concomitantemente con la leucoplaquetopenia y bajos niveles de complemento sérico negativizó la expresión cutánea tipo Arthus tanto a los 8 días pi (de 6 cobayos sólo 1 dió reacción cutánea positiva), como a los 11 días pi (de 3 animales ninguno presentó el fenómeno de Arthus). Por el contrario, las reacciones observadas en los cobayos inoculados con virus no patógenos no presentaron diferencias con respecto a los controles sin infectar ya que a los 11 días pi en 5/5, 4/4 y 4/4 animales que recibieron $XJCl_3$, XJ_0 y Tacaribe, respectivamente, la reacción resultó francamente positiva. 2) Hipersensibilidad mediada por células (HC): *a*) dermatitis de contacto al 2-4-dinitro fluorbenceno (DNFB) medida por la hinchazón de la oreja, y *b*) tipo tuberculínico al Derivado Proteico Purificado (PPD). Con respecto a la HC de contacto, se puso en evidencia la acción deletérea que produce la cepa XJ sobre el aparato inmunológico ya que el estudio estadístico relacionando la oreja en la que se aplicó el DNFB desencadenante y la usada como control sin desencadenar, no mostró diferencias significativas ($p > 0.2$). En lo que respecta a los cobayos inoculados con los virus $XJCl_3$, XJ_0 y Tacaribe evidenciaron una reacción homologable a los animales sensibilizados controles sin infectar, registrándose un aumento significativo en el índice de engrosamiento entre la oreja desencadenada con DNFB y la que sirvió de control ($p < 0{,}001$). De la misma forma la infección con la cepa XJ produjo una profunda depresión en la reacción tuberculínica ya que de los 10 cobayos estudiados ninguno presentó una reacción cutánea al PPD, mientras que las reacciones observadas en los animales inoculados con los virus XJ_0 y Tacaribe (6/6 y 6/6, respectivamente) dieron reacción positiva, no mostrando diferencias con los controles sin infectar que resultaron positivos en 15/15 animales. Con la cepa $XJCl_3$ se observó una supresión parcial de la reacción al PPD ya que sólo 3/6 animales dieron resultados positivos. Los datos mostraron que la cepa XJ multiplica en los órganos linfoides comprometidos en la respuesta inmune, lo que no fue observado con los virus XJ_0 y Tacaribe. En lo que respecta a la cepa $XJCl_3$ la depresión parcial que indujo es coincidente con una discreta replicación del virus en órganos linfoideos. Se sugiere una estrecha relación entre multiplicación viral que induce alteraciones histológicas y funcionales en los órganos linfoides y la inmunosupresión.

73

Estudio comparativo de la infección in vivo de células dendríticas y macrófagos del tejido linfático del cobayo con 2 cepas de virus Junin (XJ y $XJCl_3$)

R. M. Laguens, J. G. Chambó, R. P. Laguens

Cátedra de Patología II, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Por métodos de inmunofluorescencia se ha descripto que en el cobayo infectado con virus Junin las células del tejido linfático que muestran determinantes antigénicos virales poseen aspecto de macrófagos o células reticulares. Con el fin de caracterizar mejor las poblaciones celulares susceptibles de ser infectadas con virus Junin se diseñó el siguiente experimento: Cobayos adultos de 300 g de peso fueron infectados por vía intramuscular con 1000 DL_{50} de virus Junin cepas XJ y $XJCl_3$ y se sacrificaron en grupos de 2 a los 4, 7, 9 y 11 días para los inoculados con XJ y a los 4, 7, 14, 21, 28, 40 y 60 días post-infección para los inoculados con $XJCl_3$, procediéndose a la extracción del bazo y ganglios linfáticos. Los macrófagos y células dendríticas fueron separados con la siguiente técnica: suspensiones celulares de los órganos fueron centrifugados en un gradiente de Ficoll-Hypaque. Las células mononucleares se incubaron 2 horas a 37°, eliminándose la población no adherente al vidrio. Con el fin de separar las células dendríticas de los macrófagos, las células desprendidas espontáneamente a las 24 horas post-siembra se subfraccionaron por su capacidad de

formar rosetas con glóbulos rojos opsonizados y centrifugándolas en gradientes de Ficoll-Hypaque, caracterizándoselas por criterios morfológicos, citoquímico y determinación de receptores de superficie. En estas dos poblaciones celulares se pesquisaron determinantes antigénicos de virus Junin por inmunofluorescencia y se realizaron aislamientos por inoculación intracerebral en ratón recién nacido. En los animales infectados con la cepa $XJCl_3$ el estudio inmunofluorescente mostró positividad solamente en células dendríticas desde los 7 a los 28 días pi, siendo negativo en días posteriores, coincidiendo esas fechas con aislamientos positivos de virus Junin. En los macrófagos no se observaron determinantes antigénicos por IF ni fue posible aislar virus. Por el contrario, en los animales inoculados con la cepa patógena XJ se observó virus Junin en los macrófagos, coincidentemente con aislamientos positivos, desde los 4 a los 11 días pi. Estos resultados indican que en la infección in vivo del cobayo con las cepas $XJCl_3$ y XJ de virus Junin se observan diferentes tropismos celulares. En tanto que la primera infecta selectivamente las células dendríticas sin extensión a los macrófagos, la XJ infecta macrófagos. Estas observaciones permiten explicar parcialmente la diferente acción patógena y eficiencia de replicación de ambas cepas virales.

74

Replicación in vitro de dos cepas de virus Junin (VJ) en monocitos y macrófagos humanos

P. H. González, R. P. Laguens

Cátedra de Patología II, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

En un trabajo anterior se demostró que el VJ replica activamente en macrófagos peritoneales murinos. Dado que el humano es una de las especies sensibles a la infección con el citado virus y que es conocido que algunos virus replican de diferente forma en los monocitos que en los macrófagos derivados de los mismos, se diseñó el siguiente experimento: Los monocitos de sangre periférica de humanos dadores normales de banco de sangre se separaron por su propiedad de adhesión al vidrio previo fraccionamiento de células mononucleares en un gradiente de Ficoll-Hypaque. Las células así cultivadas adquieren características de macrófagos a partir del 4º día de siembra. Cultivos de 2 días (monocitos) y de 7 días (macrófagos) se infectaron con VJ, cepas XJ y $XJCl_3$ con una multiplicidad de infección de 0.1. A los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11 y 13 días post-infección (PI) se obtuvieron muestras del sobrenadante para titulación viral en monocapas de células Vero y se sacrificaron cultivos para la pesquisa de determinantes antigénicos de VJ por inmunofluorescencia. Como controles se utilizaron cultivos hermanos que se trataron con homogenato de cerebro de ratón no infectado. En total se realizaron 11 experimentos. La infección con VJ no produjo alteraciones de la morfología o adhesividad celular persistiendo los cultivos viables hasta 13 días PI y los de monocitos hasta 7 días PI, tiempos en los que se dieron por finalizados los experimentos. A partir de las 72 horas PI se observó fluorescencia positiva en el 60 % de los macrófagos, la que persistió hasta el final del experimento. En los monocitos los determinantes antigénicos de VJ se pudieron demostrar a partir de las 48 horas PI. En los sobrenadantes, tanto de monocitos como de macrófagos infectados, se aisló virus a partir de las 48 horas PI con títulos crecientes que superaron los 4 logaritmos de la $DICT_{50}$/ml a los 6 días PI en los macrófagos y los 3 logaritmos en los monocitos al 5º día PI. Los resultados fueron similares para ambas cepas virales. Estas observaciones indican que el VJ replica eficientemente tanto en monocitos como en macrófagos humanos sin producción de efecto citopático, lo que apoya la opinión de que estas células son blanco de la replicación en la infección natural humana.

75

Susceptibilidad del cobayo recién nacido a una cepa atenuada de virus Junin

R. M. Laguens, R. P. Laguens

Cátedra de Patología II, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Con el propósito de analizar alguno de los aspectos concernientes al rol que juega el sistema inmune del cobayo en la producción de daño hístico durante la infección experimental con virus Junin, se inocularon 40 cobayos recién nacidos de menos de 48 horas de vida, utilizando 1000, 100 000 y 1 000 000 DL_{50} de la cepa $XJCl_3$ de virus Junin por vía intranasal (IN) y 1000 DL_{50} por vía intramuscular (IM). Los animales fueron controlados diariamente, registrándose el peso y mortalidad durante la duración del experimento. Grupos de 2 animales fueron sacrificados a los 3, 6, 9, 12 y 15 días post-infección (PI), realizándose una autopsia detallada junto con los muertos espontáneamente obteniéndose muestras de hígado, riñón, páncreas, bazo, ganglio linfático, timo, salivales, corazón, pulmón, adrenales, cerebro y cerebelo que se procesaron para su estudio con el microscopio de luz e inmunohistoquímico utilizando técnicas de inmunofluorescencia (IF). También se obtuvieron en forma estéril muestras de cerebro para aislamiento y titulación viral. Todos los animales, tanto los inoculados por vía IM como IN, presentaron alrededor del día 11 post-infección (PI) un neto adelgazamiento con hipertermia y fino temblor generalizado, muriendo entre los 13 y 15 días PI con un promedio del día de muerte de 13.5. Ni el cuadro clínico, mortalidad o día de muerte variaron al utilizar diferentes dosis de virus Junin. El examen de los animales sacrificados o muertos espontáneamente mostró en 4 de ellos hemorragias nasales y orales, lesiones enantemáticas en cavidad oral y petequias en tejido celular subcutáneo y peritoneo. El microscopio de luz mostró a partir de los 3 días PI lesiones de tipo inflamatorio linfocitario en páncreas cuando se utilizó la vía IM. En el encéfalo se observó leptomeningitis y perivasculitis en la totalidad de los animales muertos espontáneamente y en todos aquellos sacrificados a partir del día 12 PI, ya sea inoculados por vía IM como IN sin guardar relación con la dosis suministrada. Por técnicas de IF fue posible detectar determinantes antigénicos de virus Junin en páncreas y bazo a partir de los 3 días PI. El cerebro y cerebelo mostraron fluorescencia positiva en neuronas en todos los animales muertos espontáneamente y en 4 de 8 sacrificados a los 9 y 11 días PI. No se pudo aislar virus infeccioso en encéfalo cuando se utilizaron cultivos de células Vero; sin embargo, se encontraron bajos títulos cuando el aislamiento fue realizado inoculando ratones recién nacidos por vía intracerebral. Estos datos indican que el cobayo recién nacido es susceptible a la cepa $XJCl_3$ de virus Junin, el que produce mortalidad del 100 %. Tal mortalidad no depende de la dosis ni de la vía de inoculación utilizada. Por otro lado, la cepa $XJCl_3$ de virus Junin se comporta en este modelo animal como neurotropa, causándole la muerte alrededor de los 13 días PI a través del daño encefálico probablemente mediado por células del sistema inmune, aunque no es posible descartar una acción viral directa.

76

Efecto del virus Junin sobre leucocitos polimorfonucleares humanos cultivados in vitro

C. Ponzinibbio, P. González, J. G. Chambó, R. P. Laguens

Cátedra de Patología II, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

La leucopenia constituye una de las características constantes del cuadro clínico de la Fiebre Hemorrágica Argentina. Los mecanismos que conducen a esta alteración no son conocidos. Con el fin de indagar si el virus Junin produce un efecto citopático directo sobre los leucocitos polimorfonucleares se diseñó el siguiente experimento: Leucocitos polimorfonucleares humanos se separaron de sangre periférica de dadores de banco de sangre por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque, sedimentación en dextrán y lisis osmótica de eritrocitos, obteniéndose una pureza del 99 %. Las células (3.5×10^6/ml en medio RPMI 1640 con buffer Hepes) se incubaron en tubos plásticos con virus Junin (VJ), cepas XJ y $XJCl_3$, con una multiplicidad de infección de 0.1 durante una hora. El stock viral procedió de cerebro de ratón lactante con un título inicial de $10^{8.5}$ DL_{50}/ml. Como controles se utilizaron para

cada experimento incubaciones con cerebro de ratón lactante normal en la misma dilución que el stock viral. Los cultivos se sometieron a agitación constante obteniéndose muestras para recuento de células viables a las 2, 8 y 20 horas post-infección en 17 experimentos. En 6 experimentos se determinó actividad peroxidásica en el sobrenadante libre de células y en 3 se realizó estudio morfológico ultraestructural. Como controles del efecto viral se incubaron cultivos paralelos con virus Junin inactivado por luz ultravioleta en 5 experimentos y neutralizando con suero específico en 3 experimentos. La incubación de leucocitos polimorfonucleares con virus Junin produjo una disminución del 25 % de células viables comparadas con los controles. Este efecto, ya apreciable a las 8 horas post-infección, se hacía notorio a las 20 horas, tiempo de finalización de los experimentos. La actividad peroxidásica del sobrenadante fue 45 % más elevada en los tubos infectados que en los controles. Estos efectos fueron anulados cuando se trataron los cultivos con virus neutralizado o inactivado con luz ultravioleta. El estudio ultraestructural de los cultivos infectados mostró a partir de las 2 horas post-infección alteraciones de los gránulos de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos con disminución de la densidad electrónica y del número. Estas observaciones indican que el virus Junin ejerce una acción citotóxica directa sobre los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos humanos, provocando un incremento de la mortalidad in vitro y de la liberación de peroxidasa y disminución del número de granulaciones citoplasmáticas. Aparentemente estos efectos son específicos del virus infeccioso, ya que son anulados por la neutralización o inactivación.

77

Infección de cobayos con virus Junin por vía nasal

S. R. Samoilovich, Mercedes C. Weissenbacher

Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Se ha comprobado que virus de distintos grupos (Arbovirus, Rabdovirus, Arenavirus) poseen la propiedad de infectar animales de laboratorio cuando éstos son inoculados por vía respiratoria. En el caso del virus Junin se comprobó la infección de *Calomys musculinus* lactantes por vía nasal, pero existían pocos datos acerca de la infección de cobayos por esta vía. Experiencias realizadas en nuestro laboratorio mostraron que cuando se inoculan cobayos por vía oral con 3 y 10^5 $DICT_{50}$ de la cepa atenuada del virus Junin $XJCl_3$ el 30 % de los animales resultan infectados, elevándose esta cifra al 85 % cuando se repite la inoculación a las 24 y 72 h de la primera. Por otra parte, cuando fueron inoculados 5 cobayos con 3 x 10^5 $DICT_{50}$ de la cepa patógena XJ por vía oral, se infectaron 3 animales. Dado que los distintos sistemas de inoculación oral utilizados no permitieron alcanzar el 100 % de infectividad que produce la inoculación del virus Junin al cobayo por vía intramuscular (im) se decidió probar en este trabajo la vía nasal. Se inocularon 3 grupos de 6 cobayos cada uno con 3 x 10^5, 3 x 10^4, 3 x 10^3 $DICT_{50}$ de la cepa XJ del virus Junin. Con las dos dosis mayores murieron todos los animales de cada grupo, y con la menor dosis murieron 5 animales y el sobreviviente desarrolló anticuerpos neutralizantes séricos. Al demostrarse que la cepa patógena puede matar a la totalidad de los cobayos cuando es inoculada por vía nasal se programó un experimento de inoculación con la cepa atenuada por vía nasal y desafío con la cepa patógena por la misma vía. Por lo tanto, 24 cobayos fueron inoculados por vía nasal con 3 x 10^5 $DICT_{50}$ de la cepa atenuada $XJCl_3$. Estos animales perdieron peso a partir de la segunda semana post-inoculación (pi), recuperándolo luego, con excepción de 5 cobayos que murieron entre los 15 y 21 días pi. Los animales muertos presentaron en la autopsia ganglios, suprarrenales y pulmones congestivos, y a veces infarto hemorrágico pulmonar. La búsqueda de virus en los órganos de los animales muertos sólo demostró la presencia de títulos mínimos en 2 de los 5 cobayos, en ganglio, pulmón y bazo. Los cobayos sobrevivientes a la inoculación con la cepa $XJCl_3$ fueron sangrados a los 48 días

pi para la determinación de anticuerpos neutralizantes y posteriormente fueron desafiados con 3 x 10^4 $DICT_{50}$ de la cepa patógena XJ por vía nasal. Por la misma vía se desafiaron 11 cobayos normales utilizados como control. Todos los animales previamente inoculados con $XJCl_3$ presentaron anticuerpos y resistieron el desafío posterior con la cepa XJ, mientras que los 11 controles murieron entre los 11 y 16 días con el cuadro típico de la FHA experimental. Estos resultados permiten establecer que la vía nasal es más apropiada que la oral para la infección de cobayos con el virus Junin, y que con la cepa atenuada $XJCl_3$ se obtienen los mismos resultados con la vía nasal que con la vía intramuscular, con respecto a la mortalidad de los animales y a la protección de los mismos contra el desafío posterior con la cepa patógena XJ.

78

Insuficiencia del enzimo-inmunoensayo para la detección de rotavirus en materia fecal

S. Grinstein, M. A. Valvano, J. Gómez

Laboratorio de Virología-Serología, Hospital de Niños, Buenos Aires

El rotavirus (RV) es un agente diseminado en todo el mundo que con frecuencia causa gastroenteritis aguda en niños menores de 3 años. En Capital Federal y Gran Buenos Aires, alrededor del 30 % de las diarreas agudas en niños hospitalizados son debidas a RV. Han sido desrrollados varios métodos diagnósticos que permiten detectar este virus en materia fecal (MF), tales como: microscopía electrónica (ME), inmunoelectromicroscopía, fijación de complemento, contrainmunoelectroforesis (CIE), radioinmunoensayo, enzimo-inmunoensayo (ELISA) y hemaglutinación reversa. Todas estas técnicas varían en sensibilidad y practicidad. El propósito de este trabajo es mostrar los datos obtenidos comparando la CIE con 2 sistemas de ELISA. La CIE fue realizada como ha sido descripta previamente por nosotros, sin variantes. Se utilizó un ELISA comercial, Rotazyme (Abbott), que se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El otro sistema fue diseñado por R. Yolken (N.I.H.) y se realizó según la técnica descripta por este autor. Como control de la especificidad de la CIE, las bandas de precipitación fueron cortadas, homogeneizadas en PBS y observadas al ME. Se emplearon 2 controles positivos: un pool de 8 MF positivas previamente por ME y CIE, que también fueron positivas por los 2 sistemas de ELISA; y rotavirus de mono cepa-SA-11, 10^8 partículas/ml, también positivo por todas las técnicas ensayadas. Se estudiaron hasta el momento 10 MF provenientes de niños hospitalizados con diarrea aguda. De éstas, 9 (90 %) fueron positivas por CIE y sólo 2 (20 %) por ELISA. Efectuando ME de las bandas de precipitación homogeneizadas, se encontró que de las 9 MF positivas por CIE, 7 (77 %) mostraron partículas virales en forma de agregados de morfología y tamaño compatible con RV. Del total de MF positivas por ME, sólo 2 también lo fueron por ELISA. Las técnicas inmunoenzimáticas han sido consideradas al menos tan sensibles como la ME y de sensibilidad superior a la CIE. Pero el RV posee 11 segmentos de ARN de doble cadena que en presencia de las condiciones apropiadas tienen gran variabilidad en sus patrones electroforéticos, lo cual podría deberse a cambios en su secuencia de bases. Esto sugiere a su vez cambios antigénicos. Asimismo, se han descripto al menos 4 serotipos de RV aislados de materias fecales humanas. Ambos sitemas de ELISA aquí empleados son manufacturados en EE.UU., uno de ellos sobre la base de virus SA-11 y el otro de virus humanos aislados de MF y de varios pasajes en cerdos gnotobióticos. Es probable que los anticuerpos inducidos por estos virus sean insuficientes para detectar la presencia de diferentes serotipos. Por lo tanto, nuestros datos sugieren indirectamente, la presencia de distintos serotipos de RV y enfatizan la necesidad de incrementar los estudios a este respecto en nuestro país.

79

Descripción de una línea celular BHP/21 persistentemente infectada con virus Junín. Su utilidada para fines diagnósticos

GUADALUPE CARBALLAL, P. M. COSSIO, ADRIANA RABINOVICH, J. OUBIÑA, R. M. ARANA

Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y Sección Inmunología, CEMIC, Buenos Aires

La técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre células infectadas por el virus Junín se ha mostrado útil para detectar anticuerpos específicos en etapas tempranas de la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA). Sin embargo, no es técnicamente fácil la obtención de monocapas infectadas en forma aguda, que expresen el antígeno viral de manera homogénea, para la realización adecuada de la técnica. En el presente trabajo se describe una línea de células BHK/21 persistentemente infectadas por virus Junin. Durante 4 pasajes consecutivos, se observó que 30 a 45 % de las células presentaban una intensa reacción nodular citoplasmática por inmunofluorescencia indirecta, empleando diversos antisueros anti-Junin (sueros de convalescientes de FHA así como experimentales). Estudiada la línea celular se observaron los siguientes hechos: *a*) inoculándola por vía intracerebral (las células o el sobrenadante del medio de cultivo), era letal para el ratón lactante, e inocua para el adulto. El cuadro neurológico era idéntico al de la FHA experimental del ratón, y el mismo era abolido realizando neutralizaciones con un suero hiperinmune contra virus Junin; *b*) la inoculación a cobayos de las células BHK/21 no indujo enfermedad, pero los mismos desarrollaron anticuerpos anti-virus Junin, y resistieron un desafío posterior con 10^3 DL_{50} de virus Junin, cepa XJ. Dada la intensa concentración de antígeno viral que presentaban estas células, y la adecuada distribución en la monocapa de células positivas y negativas, fueron empleadas para detectar anticuerpos inmunofluorescentes en muestras seriadas de 32 convalescientes de FHA. Los resultados obtenidos fueron superiores a los observados empleando células infectadas en forma aguda, ya que en este último caso la infección menos homogénea de la monocapa dificulta la lectura. La utilidad de la línea para fines diagnósticos es evidente, y además la misma puede ser empleada para estudios de infección viral persistente.

80

Fibrosis hepática experimental en el conejo por acción del dietiletilbestrol y acción inhibidora de la progesterona

GISELA HEINRICHS DE KREMER, A. LANARI

Hospital Regional de Neuquén e Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Se conoce que la administración prolongada de dietiletilbestrol produce una importante fibrosis en el hígado de conejos (Numano et al, 1972). El objeto de este trabajo ha sido el de investigar si existe un efecto inhibidor de esta fibrosis hepática por acción de la progesterona. Se utilizaron 23 conejos machos jóvenes de aproximadamente 3 kilos, de raza New Zealand. Se administró 6 días por semana por vía bucal 10 mg de dietiletilbestrol en aceite durante lapsos entre 3 y 6 meses; no se suspendió el dietiletilbestrol hasta que fueron sacrificados. A la mitad de los conejos se les administró día por medio, intramuscular 30 mg de progesterona hasta la terminación del experimento. Los que murieron antes del lapso programado lo fueron por afecciones intercurrentes. El estudio anatómico se llevó a cabo realizando autopsias completas, fijando el hígado a estudiar en formol al 10 % o alcohol 80 %. Por microscopía óptica se observó una notable producción de fibrosis portal y septal después de 3 meses de iniciado el dietiletilbestrol, llegándose en algunos casos a la formación de nódulos y seudolobulillos. En los conejos que habían recibido simultáneamente progesterona se comprobó una neta disminución o ausencia de la fibrosis. Este efecto de la progesterona se observó en todos los conejos que fueron tratados más de 3 meses en la forma descripta.

81

Eferencias neuroendocrinas del ganglio simpático cervical superior. Modificaciones tempranas en la función tiroidea luego de la gangliectomía

D. P. Cardinali, M. Pisarev, Marta Barontini, G. Juvenal, R. J. Boado, María I. Vacas

Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), Comisión Nacional de Energía Atómica, Centro de Investigaciones Endocrinológicas y Centro de Medicina Nuclear, Buenos Aires

Además de proveer inervación simpática a la glándula pineal el ganglio cervical superior (GCS) inerva diversas estructuras cefálicas como los vasos piales e hipofisarios y plexo coroideo, y a estructuras extracraneanas como la glándula tiroides y cuerpo carotídeo. Recientemente hemos obtenido evidencia acerca del posible significado neuroendocrino de algunas de estas conexiones neurales en ratas sometidas a gangliectomía bilateral (Gx) varios días antes. Así por ejemplo la Gx crónica produce una disminución en los niveles plasmáticos de prolactina, que no son explicables por cambios en la función pineal. Tampoco lo es la modificación aguda y transitoria (1as 24-48 h) en la respuesta dipsógena luego de la Gx en ratas. En la glándula tiroides la Gx produce a los 7 días un aumento en la sensibilidad a la TSH endógena o exógena, y a los 30 días un bocio espontáneo. Ambos efectos se observan también en animales pinealectomizados y cursan con niveles normales de TSH en plasma, lo que sugiere un efecto intratiroideo de la desnervación crónica. Es conocido por estudios realizados en la glándula submaxilar y membrana nictitante que luego de la Gx, y dependiendo de la longitud del cabo nervioso residual, se produce en el territorio simpático correspondiente una liberación espontánea de norepinefrina (NE) de los terminales neurales (reacción de degeneración) que comienza 10-14 h luego de la ablación ganglionar y dura unas 8-10 h. Esta liberación se acompaña de cambios postsinápticos semejantes a los observados luego del estímulo nervioso normal. Nos pareció por lo tanto de interés analizar el efecto agudo de la Gx sobre la función tiroidea en la rata. En un primer experimento se estudiaron los cambios en la concentración tiroidea de NE (pg/mg) a distintos tiempos luego de la Gx. Entre las 8 h y las 16 h ésta disminuyó de 551.3 $\pm$ 55.9 (5) a 20.7 $\pm$ 7.4 (5) (media $\pm$ ES, n) alcanzando el mínimo valor a las 24 h: 9.2 $\pm$ 2.8 (6). A las 14 h de la Gx se observó una depresión significativa en la captación de ^{131}I (relación "tejido/plasma": (T/P): Gx 3.06 $\pm$ 0.45 (6), operación simulada 6.17 $\pm$ 0.41 (7) ($p < 0.01$), que no fue detectada 6 h más tarde, cuando ya la degeneración de los terminales simpáticos se había completado (Gx 4.03 $\pm$ 0.33, op. sim. 4.09 $\pm$ 1.54). Si bien a las 14 h de la Gx se detectaron niveles plasmáticos disminuidos de TSH (ng/ml) (Gx 105 $\pm$ 20, op. sim. 339 $\pm$ 20, $p < 0.02$) la inyección de 250 mU de TSH no restituyó la captación de ^{131}I a niveles normales (T/P; Gx + TSH: 4.62 $\pm$ 0.40), sugiriendo un cambio de sensibilidad tiroidea a la TSH. Tal cambio en sensibilidad fue avalado también por el efecto de la inyección de TSH en ratas controles, las que a diferencia de las Gx, mostraron una depresión significativa de la captación de ^{131}I (T/P en op. sim. + TSH: 3.96 $\pm$ 0.17). Es decir, la inyección de TSH, que en animales controles disminuyó la captación de ^{131}I, en los Gx la aumentó, indicando una interacción significativa "cirugía x hormona" (análisis factorial, $p < 0.01$). La organificación del ^{131}I en la tiroides no fue afectada por la Gx. Los cambios en TSH plasmática se circunscribieron al período de degeneración de los terminales simpáticos, no observándose antes (Gx 184 $\pm$ 48 y 260 $\pm$ 17; op. sim. 147 $\pm$ 22 y 241 $\pm$ 69 a las 3 y 8 h de la cirugía respectivamente). Estos resultados indican que la Gx produce en forma aguda modificaciones en la liberación de TSH y en la sensibilidad de la tiroides a su hormona trófica. Tales cambios pueden explicarse por la liberación de NE de los terminales simpáticos centrales y periféricos en degeneración.

82

Efecto del hipertiroidismo experimental sobre la captación de noradrenalina en el sistema nervioso central

B. E. Fernández, A. E. Domínguez, N. A. Vidal, A. Martínez Seeber

Orientación Fisiología Humana, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Estudios anteriores demostraron que el hipertiroidismo experimental provocado por la triyodotironina produce un aumento de la concentración de la noradrenalina (NA) en el hipotálamo de la rata, sin afectar otras regiones del sistema nervioso central. La finalidad de este estudio fue investigar si dicho incremento podía ser provocado por un aumento de la captación de la amina tritiada por el tejido nervioso. Las experiencias se realizaron en ratas Wistar macho tratadas con triyodotironina sódica (20 μg/día durante 10 días) y a las que se inyectó 200 mg/kg i.p. de α metil-p-tirosina, dos horas antes para inhibir la síntesis de catecolaminas. Se perfundió una solución conteniendo 5 μg/ml de dl-7-^{3}HNA (0.32 μCi/μg de actividad específica) a razón de 0.04 ml/min durante una hora a través de un catéter colocado en el tercer ventrículo cerebral. Al cabo de las perfusiones, los animales se sacrificaron por decapitación y se disecaron los hipotálamos y bulbos raquídeos, separándose por ultracentrifugación a 100 000 G en sacarosa 0.32 M la fracción citoplasmática (soluble) y granular (sedimento). Las catecolaminas totales se midieron en alícuotas del ultracentrifugado. La NA se extrajo por cromatografía en óxido de aluminio. Por diferencia entre ambas se calcularon los metabolitos (Palaic y Khairallak, *Biochem Pharmacol* 16: 2291, 1967). La radioactividad de las muestras se midió por métodos convencionales. Los resultados mostraron un aumento de la captación de NA tritiada con respecto a los controles en el hipotálamo: fracción citoplasmática: 204 % ($p < 0.005$) y fracción granular 222 % ($p < 0.001$) y en el bulbo raquídeo: citoplasmática 142 % ($p < 0.001$) y granular 123 % ($p < 0.005$). Los metabolitos de la NA también aumentaron en el hipotálamo y granular 122 % ($p < 0.005$) y en el bulbo raquídeo: citoplasmática 48 % ($p < 0.01$) y granular 105 % ($p < 0.001$). Los resultados obtenidos permiten postular que la triyodotironina estimula la captación de ^{3}H-NA en las áreas del sistema nervioso central estudiadas, lo que explicaría los hallazgos anteriores de un incremento de la NA endógena en hipotálamo de animales con hipertiroidismo experimental. Este efecto se verifica sobre ambos "pools" de catecolaminas.

83

Efectos del calcitriol, de la hormona tiroidea y de fármacos adrenérgicos sobre la fosfatasemia alcalina "intestinal" de ratas y perros enteros y tiroparatiroprivos

J. L. Ferretti, A. Raynald, G. Juster, H. Abranzón, D. Echave, E. Iriarte, J. O. Comba, R. C. Puche

Cátedra de Biología I-II, Facultad de Ciencias Bioquímicas, Cátedra de Fisiología, Facultad de Veterinaria y Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Rosario

En trabajos anteriores se expuso evidencia de una relación funcional entre la hormona paratiroidea y la tasa sérica de actividad fosfatásica alcalina "intestinal" (inhibible por l-fenilalanina), en adelante APAis. El presente estudio complementa esa evidencia estudiando el efecto de hormonas y drogas que pueden inducir tanto variaciones de la APAis como cambios indirectos de la secreción de PTH endógena. Ocho ratas de 40 d fueron tiroparatiroidectomizadas (TPTX) y otras 8 se mantuvieron como controles "sham". Tras 6 de control y toma de sangre basal, cada grupo se subdividió en 2 de 4, que recibieron, respectivamente: *a*) 2 x 1 μg/kg de calcitriol SC/d, o *b*) 6 x 20 μg/kg/8 h de levo-tiroxina oral, controlándoselos durante 48 h y ayunándolos en las últimas 24, al final de las cuales se tomó una segunda muestra de sangre de la cola

para dosar APAis y calcemia. La TPTX redujo la APAis a menos de la mitad en todos los animales ($p < 0.001$). El calcitriol elevó la calcemia en las ratas enteras (11.4 ± 0,3 mg/dl, $p < 0.01$) y TPTX (11.5 ± 0.4 mg/dl $p < 0.001$); descendió la APAis en las primeras 22 ± 4 vs 6 ± 2 UKA/dl, $p < 0.001$) y no modificó los valores bajos de las TPTX. La levotiroxina no modificó significativamente ni calcemia ni APAis en ningún caso. Se interpreta que el calcitriol descendería normalmente la APAis por provocar hipercalcemia e inhibición paratiroidea secundaria, en tanto que sus efectos directos y los de la hormona tiroidea sobre la isoenzima sérica no parecen importantes. Observaciones previas nos permitieron descubrir efectos inhibitorios de los beta-bloqueantes, y estimulantes de los beta-estimulantes adrenérgicos sobre la APAis en ratas y perros enteros, que podían interpretarse como vehiculizados vía cambios paratiroideos inducidos secundariamente. Siete ratas TPTX tratadas ahora con propranolol (4 x 12 mg/kg/45 min IP). y 6 perros TPTX que recibieron isoproterenol (0.1 μg/kg/min EV x 4 h) mantuvieron su APAis en los valores basales postoperatorios (2.6 ± 0.3 y 0.9 ± 0.4 UKA/dl respectivamente), al contrario de lo observado en presencia de las paratiroides. Esta falta de efectos en el animal TPTX se interpreta como evidencia adicional de que los cambios referidos antes habrían sido producidos indirectamente por la PTH endógena. Nuevos experimentos preliminares, efectuados administrando péptido 1-34 de PTH sintético (Beckman) a ratas TPTX 6 d antes, en perfusión EV continua, a dosis tan altas como de 15 μg en 12 h, no han conseguido, sin embargo, elevar su tasa de APAis, si bien tampoco se observaron cambios calcémicos significativos. Estos resultados son difíciles de interpretar por el momento. Lo más probable es que este último modelo no resulte adecuado para manifestar los efectos de la hormona heteróloga. Los dos primeros experimentos, en cambio, presentan nuevas evidencias, si bien indirectas aún, de la propuesta relación funcional entre APAis y PTH endógena.

84

Estudio comparativo del peso de los órganos linfáticos en estro y diestro en ratones CBA/CAJ

L. L. Colombo, J. Herkovits, R. L. Belotti, N. Belmonte, Nilda Fink-Cabutti, Yolanda P. de Bonaparte

Instituto de Biología de la Reproducción y Desarrollo Embrionario, Universidad Nacional de Lomas de Zamora e Instituto de Oncología A. H. Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Durante la preñez se produce un aumento del peso de los ganglios drenantes del útero y del bazo. El objetivo del presente trabajo fue investigar la posible variación en el peso de los órganos linfáticos de la hembra durante el ciclo estral, evaluándolo en el estro, que es cuando la hembra acepta al macho, y puede ser fecundada, y en el diestro, por ser el estadío más opuesto al anterior. Se utilizaron ratones ♀ CBA/CAJ de 4-5 meses de edad. Se determinó la fase del ciclo estral mediante colpocitología exfoliativa. Se sacrificaron 10 ratones en estro y 13 en diestro. Se obtuvo el peso de los animales, y se disecaron minuciosamente bajo microscopio estereoscópico, pesándose en forma individual los ganglios drenantes del útero, los ganglios poplíteos (como ejemplo de ganglios periféricos), el bazo, el timo, las adrenales, y el útero, utilizando una balanza analítica Mettler con sensibilidad de 0.005 mg. Los datos se analizaron mediante el test t de Student. El peso medio de los ratones en estro fue: 22.33 ± 0.35 gr; y en diestro: 20 ± 0.71 gr ($p < 0.02$), razón por la cual los resultados siguientes, en ratones en diestro (D) y estro (E) respectivamente, se expresan en mg/g de peso corporal ± ES: Ganglios poplíteos: (D): 0.041 ± 0.001; (E): 0.41 ± 0.002 (ns). Ganglios drenantes del útero: (D): 0.091 ± 0.008; (E): 0.117 ± 0.0022 (p (< 0.2) (ns). Bazo: (D): 2.66 ± 0.07; (E): 3.72 ± 0.55 ($p < 0.05$). Timo: (D): 0.85 ± 0.05; (E): 0.80 ± 0.04 ($p < 0.6$) (ns). Adrenales: (D): 0.124 ± 0.004; (E): 0.120 ± 0.002 (ns). Utero: (D): 4.34 ± 0.44; (E): 6.17 ± 0.39 ($p < 0.01$). Los resultados muestran que el peso total del animal se incrementa en estro, incremento

que se verifica en algunos órganos en forma proporcional (adrenales y ganglios poplíteos), mientras que en otros dicho incremento es aún mayor, tal como acontece en el útero. Con respecto a los órganos linfáticos, se comprobó en estro un aumento de los ganglios drenantes del útero y una disminución en el peso del timo, aunque no estadísticamente significativa; mientras que el bazo presenta un aumento significativo para este período. Cabe acotar que los ganglios poplíteos, tomados como muestra de ganglios periféricos, no variaron con respecto al peso corporal. Estos resultados sugieren que también en el sistema inmune existirían cambios cíclicos, que podrían ser preparatorios para la eventual preñez. Asimismo es de destacar que conviene tener en cuenta las variaciones cíclicas en el peso del bazo, en los trabajos de investigación, que evalúen fenómenos asociados con este órgano, aunque no sean de reproducción.

85

Procesamiento de la insulina. Su correlación con la conversión de glucosa a CO_2

J. C. Cresto, D. P. Udrisar, María del Carmen Camberos, J. C. Basabe

Unidad de Endocrinología, Hospital General de Niños Dr. Pedro de Elizalde, Buenos Aires

Se estudió la asociación insulina-receptor, la degradación de insulina y la respuesta biológica (conversión de glucosa ^{14}C a $^{14}CO_2$) en células adiposas de ratas controles (GC), ayunadas (GA-88 hs) e hiperinsulínicas (GH-hiperinsulinemia exógena). El número de células en cada caso varió (binding: GC: $2.7 \pm 0.4 \times 10^5$; GA: $3.6 \pm 0.6 \times 10^5$; GH: $1.9 \pm 0.3 \times 10^5$ – Degradación: GC: $2 \pm 0.1 \times 10^5$; GA: $2.9 \pm 0.6 \times 10^5$; GH: $1.6 \pm 0.3 \times 10^5$ – Conversión de glucosa: GC: $2.9 \pm 0.5 \times 10^5$; GA: $3.3 \pm 0.4 \times 10^5$; GH: $2.5 \pm 0.2 \times 10^5$) pero sin llegar a presentar diferencias significativas. Las asociaciones fueron estudiadas a los 5, 15, 30, 60 y 120 minutos, utilizando las siguientes dosis de insulina: 3×10^{-13}M (trazador, insulina ^{125}I) y 6.66×10^{-11}M, 10^{-9}M, 6.66×10^{-9}M, 6.66×10^{-6}M de insulina nativa más trazador. Las asociaciones demostraron que el GA presenta un porciento de captación más elevado que el GC y el GH. Con la dosis de 6.66×10^{-6}M, la captación de insulina fue próxima a cero. La degradación fue similar en todos los grupos y cayó porcentualmente en un 66 % con la dosis máxima. La conversión neta de glucosa a CO_2 fue de: GC: 4.3×10^{-2}; PA: 2.3×10^{-2}; y GH: 8.1×10^{-2} μmoles glucosa ^{14}C a $^{14}CO_2$/2 horas. El basal del GH fue 4 veces más elevado que el GC. La degradación fue cercana al 30 % en los 3 grupos y sólo cayó con la dosis de 6.66×10^{-6}M (66 %). Para el análisis cuantitativo de estos resultados se realizó la representación de Scatchard, el perfil de afinidad según ha sido relatado por De Meytz y la degradación de acuerdo a la ecuación $\frac{dP}{dt} = K_{ap} (IR)\sigma$ descripta por Terris y Steiner. Las rectas fueron trazadas por regresión lineal y las comparaciones estadísticas se realizaron con el test t de Student. Los R_0 fueron: GC: 57.7 pM; GA: 97.9 pM; GH: 87.0 pM; las constantes de afinidad ($\vec{K}$) fueron: GC: 5.23×10^8 l/mol; GA: 4.82×10^8 l/mol; GH: 1.77×10^8 l/mol y los B/F de GC: 0.0302; GA: 0.0472; GH: 0.016. Durante los 120 minutos de incubación los valores de R_0 disminuyeron aproximadamente un 75 % en los tres grupos, sin variaciones manifiestas de K. Para las dosis de 10^{-9}M de insulina el porciento de ocupación fue menor del 50 % y, pese a la disminución de sitios de ocupación, con la incubación, el porciento de ocupación no varió con el tiempo. La degradación de insulina presentó un σ próxima a 1 en los 3 grupos y los valores de Kap^{min-1} para todos los tiempos ($\bar{x}$), fueron: GC: 0.384; GA: 0.158; y GH: 0.799. Considerando que Kap representa el procesamiento de la insulina y es un índice del estado metabólico celular, se correlacionó el consumo de glucosa con los valores de Kap para cada grupo. La correlación (r: 0.941) corta a la abcisa (1.285×10^{-2} mmoles de glucosa ^{14}C a $^{14}CO_2$) en un valor similar al del consumo de glucosa no insulino-dependien-

te observado en el grupo control. En conclusión, los resultados experimentales demuestran que existe una variación en el número de receptores en los tres grupos estudiados, que dependen de la situación metabólica de la célula y se corresponden inversamente con una situación de déficit o exceso de insulina. La incubación a 37° C durante 120 minutos produce simultáneamente degradación de insulina, desaparición de sitios de combinación y la respuesta biológica buscada. En estas condiciones, la respuesta biológica es dependiente del procesamiento de insulina (K_{ap}).

86

Re-expresión de antígenos de grupo sanguíneo ABH en la superficie de células tiroideas humanas en cultivo

E. L. Khoury

Sección Inmunología, CEMIC, Buenos Aires

Células de diversos tejidos humanos expresan en su superficie aloantígenos de grupo sanguíneo ABH. Aunque las células foliculares tiroideas de individuos adultos no expresan estos antígenos, ellos están aparentemente presentes en el primordio tiroideo hasta la 12ª semana de vida intrauterina, desapareciendo posteriormente. En este estudio se ha demostrado, usando inmunofluorescencia indirecta (IFL) sobre cultivos primarios de tiroides humanas, que las células foliculares invariablemente re-expresan los antígenos ABH correspondientes a su genotipo en su superficie cuando son cultivadas en monocapa, aún por períodos breves. Este fenómeno se observó en células obtenidas de 41 tiroides adultas, normales o patológicas (bocios tirotóxicos difusos, bocios coloides multinodulares, tiroiditis crónicas, bocios dishormonogenéticos, etc.), y 2 glándulas provenientes de fetos de 14 y 17 semanas. La ausencia de antígenos de grupo sanguíneo en células tiroideas in vivo fue confirmada por IFL negativa en suspensiones celulares obtenidas de la digestión enzimática de las glándulas, mientras que los mismos antígenos fueron fácilmente detectables en suspensiones celulares obtenidas por tripsinización de monocapas ya establecidas. La identidad de las células foliculares fue determinada por la presencia de antígenos citoplasmáticos y de superficie órgano-específicos. La re-expresión de antígenos ABH fue cuantitativamente variable de una a otra célula folicular, y la imagen de IFL producida por isoanticuerpos de grupo sanguíneo fue claramente distinguible de la dada por autoanticuerpos tiroideos órgano-específicos. Por otra parte, esta re-expresión no se relacionó con la capacidad "secretora" de los individuos de quienes se obtuvo el tejido, la presencia de una particular fuente de suero en el medio de cultivo, ni el grado de división celular in vitro. Luego de 2 a 3 semanas en cultivo, la mayoría de las células tiroideas se observan morfológicamente dediferenciadas y ya no poseen antígenos de grupo sanguíneo, aunque todas expresan aún β_2-microglobulina en su superficie. Los fibroblastos presentes en estos cultivos primarios de tiroides fueron invariablemente negativos para aloantígenos ABH. Estos resultados indican que el repertorio antigénico presente en la superficie de células humanas en cultivo no es necesariamente idéntico al que esas mismas células expresan in vivo. Además, la posibilidad de que isoanticuerpos naturales de grupo sanguíneo interaccionen con antígenos de superficie debe ser tenida en cuenta en experimentos en que células tiroideas sean expuestas a sueros humanos, normales o no.

87

Deficiencia familiar de tromboxanosintetasa. Reorientación del metabolismo de los endoperóxidos cíclicos

L. O. Carreras, S. J. Machin, G. Defreyn, D. A. F. Chamone, J. Vermylen

Centro de Trombosis e Investigación Vascular, Universidad de Lovaina, Bélgica

Tres miembros de una familia en tres generaciones sucesivas presentaban una tendencia hemorrágica moderada y una alteración en la función plaquetaria. En todos ellos se observó ausencia de agrega-

ción plaquetaria con ácido araquidónico (0.6-3 mM), agregación reversible con ADP (4 mM) y los análogos de endoperóxidos cíclicos U-44069 y U-46619 (hasta 2.5 μg/ml), una sola ola de agregación con adrenalina (5.4 μM); agregación disminuida con colágeno ($^1\mu$g/ml) y marcada prolongación del tiempo de sangría (mayor de 30 minutos). No se obtuvo corrección de la agregación plaquetaria al adicionar al plasma de los pacientes un volumen igual de plasma rico en plaquetas de un sujeto normal que había ingerido aspirina 24 horas antes. La formación de malondialdehido (MDA) por las plaquetas estimuladas con N-etilmaleimida estaba disminuida (3-6 nM/10^9 plaquetas; valores normales 8 - 12 nM). El Tromboxano B_2 (TXB_2) sérico estaba reducido 33 - 101 ng/ml; valores normales 200 - 700 ng/ml). La estructura plaquetaria al microscopio electrónico era normal. Al incubar las plaquetas de uno de estos pacientes con ácido araquidónico marcado el metabolito final de la vía de lipooxigenasa, ácido hidroxieicosatetraenoico (HETE) se produjo en cantidades normales, pero la producción de TXB_2 y ácido hidroxiheptadecatrienoico (HHT), productos de la tromboxán-sintetasa, estaba disminuida, mientras que las prostaglandinas E_2, $F_{2\alpha}$, y probablemente D_2 (PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, y PGD_2) estaban aumentadas. Las plaquetas normales lavadas preincubadas con imidazol 400 μM durante 10 minutos produjeron cantidades similares de metabolitos de la vía de ciclooxigenasa a las obtenidas en el paciente. El control normal que había ingerido aspirina tenía supresión completa de todos los metabolitos de la vía de ciclooxigenasa (TXB_2, HHT, prostaglandinas E_2 $F_{2\alpha}$ y D_2). La relación PGD_2 sobre TXB_2 fue 0.11 para las plaquetas normales lavadas, 0.47 para las plaquetas normales incubadas con imidazol y 0,42 para las plaquetas del paciente. Una evidencia indirecta de la producción aumentada de la PGD_2 fue proporcionada por el aumento en los niveles de AMPc plaquetario luego de la estimulación con ácido araquidónico 1 mM, lo que no se observó en las plaquetas normales ni en las plaquetas de sujetos normales luego de la ingestión de aspirina. Las plaquetas lavadas de estos pacientes estimularon la producción de 6-oxo-prostaglandina $F_{1\alpha}$ (6-oxo-$PGF_{1\alpha}$, producto de degradación de la prostaciclina) por células endoteliales de origen bovino en cultivo pretratadas con aspirina en cantidad considerablemente mayor que las plaquetas normales. Los niveles plasmáticos de 6-oxo-$PGF_{1\alpha}$ estaban aumentados en los pacientes (439 - 703 pg/ml: valores normales 181 $\pm$ 79 pg/ml) lo que sugiere producción aumentada de prostaciclina por la pared vascular a partir de los endoperóxidos liberados por las plaquetas. La producción disminuida de TXB_2, HHT y MDA y el aumento en la formación de las prostaglandinas E_2, $F_{2\alpha}$ y D_2 y de 6-oxo-$PGF_{1\alpha}$ son compatibles con una deficiencia parcial de tromboxán-sintetasa plaquetaria y consecuente reorientación del metabolismo de los endoperóxidos cíclicos. El tiempo de sangría marcadamente prolongado observado en estos casos podría deberse no sólo a una producción disminuida de TXA_2 sino también al incremento en la producción de prostaciclina y PGD_2, sustancias inhibidoras de la agregación.

88

Función plaquetaria en pacientes diabéticos

S. S. Meschengieser, A. I. Woods, M. Sutton, M. A. Lazzari

Departamento de Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

La enfermedad vasooclusiva es una complicación frecuente en la evolución de los pacientes diabéticos y se han tratado de vincular las distintas anormalidades observadas en la hemostasia y la función plaquetaria de dichos pacientes con el desarrollo de la microangiopatía. El objeto de este estudio fue determinar las posibles alteraciones de la función plaquetaria en una población diabética y relacionarlas con el grado de compromiso vascular. Se estudiaron 52 pacientes diabéticos divididos en dos grupos 1) con complicaciones vasculares: retinopatía diabética (32), nefro-

patía diabética (1), arteriopatía periférica (2) que incluyeron 16 mujeres y 16 hombres, edad promedio 52 años (21-80), años de evolución de diabetes: 17 (2 - 35), insulina dependientes 14/32; 2) sin complicaciones vasculares (18) que comprenden 11 mujeres y 7 hombres, edad promedio: 40 (15 - 79), años de diabetes 10 (1 - 32), insulina dependientes 8/18. Se realizaron las siguientes pruebas: adhesividad plaquetaria (Hellem II). Detección de Microagregados plaquetarios (Wu - Hoak), agregación plaquetaria inducida por ADP c.f. 0.6 x 10^{-6} M y F VIII bovino 1/80, dosaje de cofactor de ristocetina (Mc Farlane) y dosaje de tromboxanos. No se observaron alteraciones en la adhesividad 1) $\bar{x}$: 43.24 % ± 19.2; 2) $\bar{x}$: 46.16 % ± 21.2. La detección de microagregados no fue globalmente diferente en ambos grupos 1) $\bar{x}$: 0.89 ± 0.11; 2) $\bar{x}$: 0.91 ± 0.10 pero 7/32 fueron positivos en el grupo 1) (21.8 %) y 3/18 (16 %) en el grupo 2. Hubo diferencias entre ambos grupos en cuanto a la agregación inducida por ADP 1) n = 29, $\bar{x}$: 47.97 % ± 23.45; 2) n = 14; $\bar{x}$: 31.86 % ± 25.17 ($p < 0.025$) y comparando el grupo con complicaciones vasculares con los normales n = 36, $\bar{x}$: 32.14 % ± 22.76 la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.005$). La agregación con F VIII 1/80 fue positiva en 12/36 (37.5 %) en el grupo 1 y en 3/17 (17.6 %) del grupo 2 comparado con 3,5 % de positividad en normales. Los niveles de cofactor de ristocetina fueron mayores en el grupo con complicaciones 1) $\bar{x}$: 148.89 % ± 85.6; 2) $\bar{x}$: 92 % ± 41.8 (0.01 $p > 0.025$). El dosaje de tromboxanos fue superior en los diabéticos con respecto a los normales D n = 46 $\bar{x}$: 61 % ± 28, N n = 35 $\bar{x}$: 49 % ± 30 ($0.025 > p < 0.05$). En tres pacientes se observó agregación espontánea y en ellos las demás pruebas resultaron alteradas. Las alteraciones son más frecuentes en los pacientes con lesiones ya establecidas pero, aunque en menor proporción, las observadas en aquellos sin complicaciones, sugieren que las plaquetas podrían jugar un rol en la enfermedad vasooclusiva diabética.

89

Actividad fibrinolítica en pacientes diabéticos

A. I. Woods, M. A. Lazzari

Departamento de Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Se ha intentado relacionar la actividad fibrinolítica con la aparición de complicaciones vasculares en la diabetes mellitus, pero los resultados obtenidos por distintos grupos de trabajo son contradictorios. Se ha descripto la participación de las plaquetas en la fibrinolisis, en especial por aporte de antiplasminas, inhibidores del plasminógeno contenido en los gránulos densos y probablemente asociado a la reacción de liberación plaquetaria y cierta actividad fibrinolítica, en especial la presencia de plasminógeno adsorbido a la membrana de la plaqueta. Con el objeto de investigar la hiperactividad plaquetaria en relación al sistema fibrinolítico asociado a la diabetes mellitus, se midió la lisis producida por euglobulinas de plasma pobre en plaquetas (PPP) y plasma rico en plaquetas (PRP) activadas con destránflufenámico, mediante dos técnicas (placas de fibrina y hubos de fibrina pequeños) en 13 pacientes con diabetes mellitus y 25 normales. Se obtuvieron los siguientes resultados: 1) *placas de fibrina:* PPP: D = $\bar{x}$: 261 mm^2 ± 61.4; = $\bar{x}$: 177.3 mm^2 ± 62.4; PRP = D = $\bar{x}$: 229.9 mm^2 ± 71.4; N = $\bar{x}$: 140 mm^2 ± 48.1; 2) *tubos de fibrina pequeños* : PPP = D = $\bar{x}$: 8.84 mm ± 1.5; N = $\bar{x}$: 7.37 mm ± 1.27; PRP = D = $\bar{x}$: 7.92 mm ± 1.6; N = $\bar{x}$: 5.97 mm ± 1.26. Hubo mayor lisis en los diabéticos y se observó una diferencia estadísticamente significativa con respecto de los normales ($p < 0.01$) en placas de fibrina; en tubos de fibrina sólo se obtuvo diferencia significativa para el PRP ($p < 0.05$). En los normales el PPP muestra una lisis superior a la del PRP, por ambos métodos, sugiriendo la acción inhibitoria de antiplasminas en el PRP. En los diabéticos no se registró tal diferencia. Como conclusión encontramos que, en la fibrinolisis, los pacientes diabéticos se com-

portan con respecto de los normales con un aumento en los niveles de activador del plasminógeno y/o con una disminución de los inhibidores de la activación del plasminógeno. Por otro lado, a pesar de mostrar una hiperreactividad plaquetaria, en otro tipo de pruebas específicas ésta no se manifiesta en el campo de la fibrinolisis. Con estos datos, no podemos descartar que el sistema fibrinolítico juegue un rol en la producción de la vasculopatía diabética.

90

Interrelación entre los efectos contráctiles de metoxamina y prostaciclina en la arteria aorta aislada de rata

E. Borda, Leonor Sterin-Borda, Martha F. Gimeno, A. L. Gimeno

Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), Buenos Aires

Se estudió el efecto de metoxamina comparándolo con el de norepinefrina (NE) exógena en arterias aortas aisladas de rata. Las aortas fueron divididas en dos porciones, una correspondiente a la región torácica y otra a la región abdominal. Se tomaron trozos de 2 cm de longitud y se los abrió en espiral, suspendiéndolos en una solución de Krebs-Ringer-bicarbonato, burbujeado con carbógeno y mantenido a temperatura de 37° C y pH 7.4. Mediante curvas acumulativas dosis respuesta de NE exógena en un rango de concentraciones que va desde 10^{-9} hasta 10^{-5}M, se pudo observar un efecto vasoconstrictor de + 50 mg ± 2.3 y + 175 mg ± 4.6, n = 5 para 10^{-9} y 10^{-5}M, respectivamente. La preincubación con regitina (10^{-5}M) desvió hacia la derecha la curva dosis-respuesta del efecto vasoconstrictor de NE exógena. Con la misma metodología se analizó el efecto de metoxamina sobre el tono de la aorta aislada; se observó que dicho agonista adrenérgico ejerció sólo efecto relajante, tanto en la aorta abdominal como en la torácica. En la primera, la dosis umbral fue de 10^{-7}M con una media de − 20 mg ± 2.3 y la dosis máxima fue de 10^{-5}M con − 75 mg ± 4.3, n = 6. En la aorta torácica la dosis umbral resultó ser 10^{-6}M con una media de − 18 mg ± 3.2 y la dosis máxima fue 10^{-4}M con − 30 mg ± 2.3, n = 6. El bloqueo de adrenorreceptores alfa con regitina bloqueó el efecto inhibitorio del tono ejercido por metoxamina en ambas regiones. Por su parte, el bloqueo beta adrenérgico con (−)-propranolol no fue capaz de modificar dicha acción vasodilatadora. Con el objeto de determinar si la acción vasodilatadora de metoxamina respondía a un efecto directo sobre el adrenoceptor alfa o era mediado por un mecanismo indirecto, se realizaron curvas acumulativas dosis-respuesta de metoxamina sobre arterias aortas previamente incubadas con indometacina (10^{-6}M) o ácido acetilsalicílico (1.8 x 10^{-4} M) durante 30 minutos. Pudo observarse que los bloqueantes de la síntesis de prostaglandinas endógenas inhibieron totalmente el efecto depresor ejercido por el agonista alfa adrenérgico. A su vez la inhibición de la prostaciclinasintetasa con tranilcipromina (50 μg/ml), también bloqueó dicha influencia vasodilatadora de metoxamina. Los resultados demuestran que en la arteria aorta los agonistas alfa adrenérgicos ejercen efectos opuestos que obedecen a dos mecanismos distintos: 1) directo, que es vasoconstrictor como el observado con NE exógena, y 2) indirecto, vasodilatador ejercido por la metoxamina, que al actuar sobre adrenoceptores alfa estimularía la liberación de prostaciclina (PGI_2), la que en última instancia sería la responsable del efecto vasodilatador observado con este agonista alfa adrenérgico clásico.

91

Reactividad de la arteria caudal de rata en medio despolarizante

J. H. Polidoro y E. A. Savino

Orientación Fisiología Humana, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

En un trabajo anterior demostramos que eliminando los efectos producidos por la liberación endógena de noradrenalina, la exposición de la arteria caudal a concentraciones altas de K sólo provoca una pequeña contracción fásica, que dura menos

de 5 minutos. En cambio, los agonistas α-adrenérgicos o la serotonina producen contracciones sostenidas. Por lo tanto, se infirió que dichas sustancias actuarían por medio de mecanismos predominantemente fármaco-mecánicos. Para verificar esta hipótesis, en el presente trabajo se estimuló con adrenalina o serotonina arterias mantenidas en medio despolarizante. Con el fin de eliminar los efectos indirectos de éste, se usaron ratas reserpinizadas o se incubó en presencia de fentolamina 3.5 μM. La solución despolarizante se preparó reemplazando el ClNa del medio de Krebs-Ringer bicarbonato por ClK, obteniéndose las concentraciones 25 y 120 mM de Na y K, respectivamente. Para efectuar experimentos con la misma reducción del Na que presenta la solución despolarizante, pero sin modificar la concentración de K, se reemplazó el ClNa por ClH-Tris. Se registró la contracción isométrica, practicándose curvas dosis-respuesta completas en condiciones controles y 5 min después de modificar la composición iónica del medio. Así las arterias fueron expuestas al medio experimental, el lapso mínimo imprescindible para obtener la relajación completa. Usando arterias de ratas reserpinizadas, la curva dosis-respuesta a la adrenalina exhibió una PD_2 de 5.75 ± 0.07 y una fuerza máxima (FM) de 350 ± 62 mg. En el medio despolarizante hubo un leve desplazamiento a la izquierda de la curva dosis-respuesta (PD_2 6.03 ± 0.08; $p < 0.02$) sin cambios concomitantes de la FM (99 ± 4 % de la control). Los controles para los experimentos en medio hiposódico tuvieron una PD_2 de 6.05 ± 0.10 y una FM de 419 ± 41 mg. La reducción del Na no produjo cambios: PD_2 5.99 ± 0.21 y FM 103 ± 3 % de la control. Las arterias reserpinizadas estimuladas con serotonina mostraron una PD_2 de 6.83 ± 0.12 y una FM de 413 ± 57 mg. En el medio despolarizante no se observaron cambios: PD_2 6.80 ± 0.07 y FM el 101 ± 3 % de la control. Los controles para los experimentos de baja concentración de Na exhibieron una PD_2 de 6.72 ± 0.04 y una FM de 436 ± 86 mg. En el medio hiposódico no se observaron cambios: PD_2 6.50 ± 0.06 y FM 99 ± 4 % de la control. En las arterias tratadas con fentolamina, la PD_2 a la serotonina fue 5.10 ± 0.09. Este valor es menor que el obtenido en condiciones normales (6.34 ± 0.09, $p < 0.001$). La exposición de la arteria al medio despolarizante no causó modificaciones, la PD_2 fue 5.09 ± 0.05 y la FM el 101 ± 1 % de la control. En conclusión, ni el medio con K 120 mM ni el hiposódico alteraron las respuestas a la serotonina o la adrenalina, salvo un leve desplazamiento de la curva dosis-respuesta a esta última cuando se elevó el K. Estos resultados sugieren que en la arteria caudal las acciones excitatorias son mediadas por una translocación de Ca que ocurre independientemente de la producción de cambios del potencial de membrana y de la participación de corrientes de Na.

92

La angiotensina no altera la reactividad de la arteria caudal de rata a diversos procedimientos de estimulación

E. A. Savino y J. H. Polidoro

Orientación Fisiología Humana, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Varios autores han demostrado que en distintos tejidos, la angiotensina potencia la liberación de noradrenalina endógena, provocada por estimulación eléctrica o concentraciones elevadas de potasio. Con estos antecedentes, decidimos investigar si este péptido modificaba la reactividad de la arteria caudal de rata a diversos procedimientos de estimulación. Se utilizó la arteria aislada, sumergida en Krebs-Ringer bicarbonato, registrándose la contracción isométrica. La curva dosis-respuesta al K se realizó, reemplazando mol a mol, el ClNa del medio por ClK. La estimulación eléctrica de campo se aplicó por medio de dos electrodos de alambre de acero inoxidable ubicados paralelamente al vaso, utilizando voltajes supramáximos y trenes de pulsos de 20 seg de duración con intervalos de 5 min. Todas las estimulaciones se aplicaron 15 min después de agregar la

angiotensina al baño tisular. La angiotensina provoca en la arteria caudal una contracción pequeña y de breve duración, que se acompaña de taquifilaxis. Hasta por lo menos 90 min después de remover el péptido, no reaparecen las respuestas. Las concentraciones de angiotensina 1.6 x 10^{-7}M y 1.6 x 10^{-6}M, producen contracciones equivalentes al 6.9 ± 1.4 % y 17.6 ± 3 % de la respuesta máxima a la adrenalina, respectivamente. Estas respuestas no se alteran por el tratamiento con fentolamina 3.5 μM o la reserpinización de los animales. La curva dosis respuesta control al K exhibió una PD_2 de 1.23 ± 0.01 y una fuerza máxima (FM) de 413 ± 44 mg. Luego del tratamiento con angiotensina 1.6 x 10^{-6}, no se observaron variaciones, la PD_2 fue 1.24 ± 0.02 y la FM el 98 ± 1 % de la control. Aplicando estimulación eléctrica de campo, la curva frecuencia-respuesta control exhibió una ED_{50} de 14.0 ± 2.5 Hz y una FM equivalente al 62.2 ± 4 % de la producida por adrenalina. Luego de agregar angiotensina 1.6 x 10^{-6}, no se encontraron cambios significativos: ED_{50} 15.3 ± 1.7 Hz y la FM fue el 99 ± 2 % de la control. Con la finalidad de detectar algún posible efecto potenciador post-sináptico de la angiotensina, se hicieron estimulaciones con adrenalina o serotonina y también con K 120 mM, pero en este último caso utilizando arterias de ratas reserpinizadas. En todos los casos la angiotensina se agregó en concentración 1.6 x 10^{-6}M, y en ninguno de los grupos estudiados produjo cambios significativos de la reactividad. Las PD_2 controles y experimentales, respectivamente, fueron las siguientes: estimulando con adrenalina 5.71 ± 0.50 y 5.73 ± 0.24; con serotonina 6.41 ± 0.21 y 6.38 ± 0.21 y con K 1.21 ± 0.02 y 1.20 ± 0.03. Tampoco se apreciaron variaciones de la magnitud de las respuestas máximas. Los resultados indican que en la arteria caudal la angiotensina no potencia las estimulaciones de tipo indirecto ni las que actúan a nivel post-sináptico. Por lo tanto el péptido no modificaría la liberación provocada de noradrenalina endógena ni la reactividad del vaso.

93

Variaciones de la secreción espontánea de catecolaminas producida por modificaciones de la osmolaridad del medio extracelular en la médula adrenal bovina

J. E. B. Pinto, R. P. Rothlin, A. E. Domínguez, Pía N. Viglione, Viviana Flores

Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina y Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Estudios recientes en distintos tejidos endocrinos que median su actividad secretoria fisiológica a través de un mecanismo exocitótico de liberación, sugieren que la última etapa de este proceso pudiese ser debida a un efecto quimioosmótico análogo al descripto en la lista del gránulo cromafín aislado. (*Inst Rev Cytol* 58: 159, 1979). El objetivo del presente estudio fue analizar las posibles modificaciones de la liberación espontánea de catecolaminas durante y consecutivas a la exposición del tejido cromafín a un medio hipertónico. Para ello se perfundieron glándulas adrenales bovinas con solución de Locke, habiéndose expuesto las mismas transitoriamente a un medio de perfusión cuya osmolaridad se incrementó adicionando NaCl, sacarosa o Tris. La exposición del tejido cromafín a una solución de Locke hipertónica por (450 mosm/kg de agua), adición de NaCl redujo en forma progresiva la liberación espontánea de catecolaminas. La magnitud de la disminución fue del 43.4 ± 5.5 % (n = 8) con respecto a los valores de liberación previos a la exposición del tejido a la solución hipertónica. Un efecto inhibitorio similar se observó adicionando sacarosa o Tris al medio de perfusión. La subsiguiente restitución del medio de perfusión hiperosmótico a una solución de Locke normotónica promovió una aguda, intensa y transitoria liberación de catecolaminas. El incremento máximo de la secreción de aminas fue aproximadamente de 6 a 30 veces el valor basal previo. Esta respuesta decae gradualmente hasta alcanzar los niveles originales luego de 15 a 20 min de su iniciación. La exposición

del tejido cromafín a dos períodos consecutivos de 10 min de duración con una solución hiperosmolar (450 mosm/kg agua), cada uno de ellos separados por 40 min de intervalo, desencadenó respuestas secretorias cuyos valores no difieren significativamente entre sí. (2da. respuesta/1ra. respuesta = 0.89). La adición al medio de perfusión de hexametonio (5 x 10^{-4}M) y atropina (10^{-5}M) 20 min antes de inducir la segunda respuesta provocada por el precondicionamiento osmótico no modificó la magnitud de la liberación de catecolaminas adrenales. Tampoco se observaron diferencias en la respuesta secretoria mediada por este mecanismo de estimulación perfundiendo durante 30 min las glándulas adrenales con una solución de Locke carente de Ca^{2+} y conteniendo EGTA (10^{-4}M). Cabe señalar que el tejido conserva la capacidad de respuesta a la acetilcolina (10^{-4}M) durante el transcurso de los experimentos. Estos resultados son compatibles con la idea de un mecanismo quimio-osmótico de liberación en la médula adrenal bovina. Además ponen en evidencia que la respuesta secretoria adrenomedular por precondicionamiento osmótico no es debida a la liberación colinérgica preganglionar y que la misma no requiere la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular.

94

Diferencias en la acción inhibitoria promovida por el verapamil sobre la respuesta secretoria adrenomedular evocada por diferentes estímulos

J. E. B. Pinto, A. Martínez-Seeber, B. Fernández, Laura B. Portugalli

Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina y Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

En el tejido cromafín adrenal bovino, la secreción de catecolaminas inducida por la acetilcolina y por concentraciones despolorizantes de K^+, es dependiente de la presencia de Ca^{2+} extracelular. Por contrapartida, la respuesta secretoria adrenomedular evocada por el Ba^{2+} y por la omisión de Na^+ extracelular no requeriría dicha condición. (*Ann Rev Pharmacol Toxicol* 17: 27, 1977). El objetivo del presente trabajo fue analizar los efectos de un antagonista orgánico del Ca^{2+}, el verapamil sobre la liberación de catecolaminas promovida por la acetilcolina (3 x 10^{-4}M); el K^+ (56 mM); el Ba^{2+} (5 mM) y la deprivación de Na^+ (por sustitución isoosmótica con sacarosa). Para ello, glándulas adrenales bovinas aisladas fueron perfundidas en sentido retrógrado con solución de Locke y expuestas a tres períodos consecutivos de estimulación. Los efectos del verapamil (3 x 10^{-4}M), fueron evaluados exponiendo el tejido cromafín durante 20 min previos al segundo período de la estimulación correspondiente. El verapamil produjo una marcada y significativa reducción de la liberación de catecolaminas promovida por la acetilcolina. La magnitud de este efecto inhibitorio fue del 91.8 % (n = 4) con respecto a la respuesta control. Cabe señalar que luego de 60 min de la aplicación del segundo ríodo de estimulación (en ausencia del verapamil) la aplicación de un tercer período de estimulación (en ausencia del antagonista) puso en evidencia una muy lenta reversibilidad de esta acción bloqueante. El verapamil además redujo en un 90.2 % (n = 5) y 86.4 % (n = 3) la respuesta secretoria evocada por 56 mM K^+ y por el Ba^{2+} (5 mM) respectivamente. Al igual que lo observado con la acetilcolina, esta acción inhibitoria fue de muy lenta reversibilidad. Contrastando con la acción bloqueante descripta, el verapamil no modificó la secreción hormonal adrenomedular inducida por la omisión aguda de Na^+ extracelular. Estos resultados sugieren que en la médula adrenal bovina el verapamil actúa antagonizando los mecanismos de secreción que promueven un influjo de Ca^{2+} (acetilcolina, 56 mM K^+) o que utilizan a los canales lentos de Ca^{2+} como vía de acceso al comportamiento intracelular para desencadenar la liberación de aminas (Ba^{2+}). Además los mismos son compatibles con la idea de que la secreción inducida por la solución de Na^+ extracelular sería independiente de la activación de los canales lentos de Ca^{2+} de la célula cromafín.

95

Efecto contráctil y producción de prostaglandinas en la arteria coronaria de perros diabéticos

LEONOR STERIN-BORDA, E. BORDA, MARTHA F. GIMENO, E. DEL CASTILLO, ANA M. FRANCHI, A. L. GIMENO

Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), CONICET, Buenos Aires

Dentro de los factores capaces de agravar la vasculopatía diabética se encuentra el espasmo vascular y el troboembolismo. Siendo las prostaglandinas potentes sustancias vasoactivas y debido a sus múltiples efectos sobre el sistema cardiovascular, nos pareció de interés estudiar la capacidad contráctil de las prostaglandinas y la generación de las mismas por las coronarias de perros diabéticos. La diabetes se provocó experimentalmente mediante pancreatectomía total, seguida de sacrificio luego de 7 días. En trabajos previos habíamos observado que los vasos coronarios provenientes de perros diabéticos respondían en forma atípica a la PGI_2, a la vez que su producción estaba aumentada. Mediante curvas acumulativas dosis-respuesta se pudo observar que la PGE_2 y la PGF_2 alfa estimularon los vasos coronarios normales, siendo sus efectos máximos con 10^{-5}M de + 48 mg $\pm$ 3.2 (n = 6) y + 40 mg $\pm$ 2.2 (n = 6) para la PGE_2 y PGF_2 alfa respectivamente. En las coronarias provenientes de animales diabéticos los efectos de PGF_2 alfa no se modificaron (+ 42 mg $\pm$ 3.2, n = 5 con 10^{-5}M); pero los correspondientes a la PGE_2 se vieron potenciados (+ 250 mg $\pm$ 12.3, n = 6 con 10^{-5}M). La preincubación con inhibidores de la tromboxanosintetasa: Imidazol (10^{-3}M) o L-8027 (10^{-6}M), inhibieron totalmente el efecto potenciador de la acción vasoconstrictora de PGE_2 que se observa post pancreatectomía. Se estudió además la influencia in vitro del araquidonato de sodio (80 μg/ml) observándose un efecto depresor del tono coronario (— 50 mg $\pm$ 3.2, n = 6), mientras que en coronarias provenientes de perros pancreatectomizados se constató una acción vasoconstrictora. La vasodilatación inducida por araquidonato de sodio en la coronaria normal fue abolida por un inhibidor de la prostaciclinsintetasa (tranylcipromina 50 μg/ml); mientras que el efecto vasoconstrictor observado en la coronaria diabética fue inhibido por Imidazol o L-8027. Se midió la producción de PGE_2 y PGF_2 alfa en arterias coronarias provenientes de animales normales y diabéticos. Los resultados obtenidos por R.I.A. expresados en picogramos/mg de peso seco del tejido fueron: PGE_2 normal: 226.2 $\pm$ 44; diabéticas 89.4 $\pm$ 19 (n = 10) y PGF_2 normal: 255 $\pm$ 53; diabéticas 359 $\pm$ 93, n = 8. Los resultados demuestran que: 1) en condiciones de diabetes experimental el camino metabólico del ácido araquidónico estaría desviado hacia la generación de tromboxano A_2 (TXA_2), lo que explicaría el efecto vasoconstrictor del araquidonato. Por el contrario en condiciones normales predomina la formación de PGI_2, como lo demuestra el efecto vasodilatador del araquidonato en este tejido; 2) el exagerado efecto vasoconstrictor de PGE_2 sobre los vasos coronarios diabéticos estaría relacionado con una estimulación en la liberación del TXA_2, ya que dicho efecto fue abolido con la inhibición de la enzima que lo sintetiza; 3) el hecho que la producción de PGE_2 esté disminuida en las coronarias de perros diabéticos, sugiere que el valor potencial de esta prostaglandina en la diabetes como factor vasoconstrictor sería incierto.

96

Análisis de la distribución del angiotensinógeno en el sistema nervioso central de la rata. Efecto del tratamiento con DOCA y sal

NIDIA BASSO, DIANA GRINSPON, PATRICIA RUIZ

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El estudio de la actividad enzimática de una isorrenina presente en el sistema nervioso central (SNC) mostró que la misma se encuentra significativamente au-

mentada en hipotálamo, cerebro, cerebelo y tallo cerebral en los animales hipertensos por el tratamiento con DOCA y sal por 30 días. La concentración de la enzima no mostró cambios significativos en estas condiciones, por lo tanto, era posible que el agente modulador de la actividad enzimática fuera el angiotensinógeno presente en el mismo tejido. Por este motivo se investigó la distribución del sustrato de la renina en las diferentes zonas del SNC en animales normales y en ratas hipertensas DOCA-sal. Se estudiaron 60 animales que se dividieron en dos grupos: 1) grupo control intacto (26 ratas); 2) grupo DOCA-sal (34 ratas): recibió 50 mg/kg de peso de cortexón depot se dos veces por semana durante 4 semanas y solución fisiológica para beber. Se registró el peso y la presión arterial (PA) de todos los animales semanalmente y al cabo de 30 días fueron sacrificados por dislocación cervical. El SNC fue lavado a través de la aorta torácica con 20 ml de solución fisiológica fría y fue extraído de acuerdo a un esquema previamente utilizado y ya descripto. Los tejidos se homogeneizaron en solución fisiológica con EDTA (8 mM) y se incubaron con 0.01 UG de renina purificada de cerdo en las condiciones habituales de nuestro ensayo. La angiotensina I (AI) formada se valoró por radioinmunoensayo. Los resultados obtenidos en los animales normales indicaron una amplia distribución del angiotensinógeno en todas las regiones analizadas del SNC. La concentración del sustrato fue mayor en hipotálamo, cerebelo y adernohipófisis que en las otras áreas. Los valores promedio fueron desde 8.09 $\pm$ 0.57 en la corteza cerebral hasta 26.38 $\pm$ 2.36 en el hipotálamo. Todos los animales tratados con DOCA y sal desarrollaron hipertensión alcanzando un valor promedio de 146 $\pm$ 3 mmHg. La renina plasmática disminuyó significativamente siendo su valor promedio final de 0.08 $\pm$ 0.01 ng AI/ml/h. Los niveles de sustrato en glándula pineal, bulbo, neuro v adeno hipófisis en los animales tratados no presentaron diferencias significativas con respecto a las mismas zonas de los animales controles. Por otra parte la concentración de sustrato fue significativamente más alta en el hipotálamo (45.8 %, $p < 0.02$), en la corteza cerebral (32.3 %, $p < 0.05$) en el cerebelo (33.9 %, $p < 0.05$ y en el tallo cerebral (13.3 %, $p < 0.02$) de los animales tratados con DOCA y sal. Los resultados presentados revelan un aumento significativo del angiotensinógeno en el sistema nervioso central en aquellas zonas donde se había detectado un incremento significativo de la actividad del sistema enzimático isorrenina-angiotensina, sin que se observaran cambios en la concentración endógena de la enzima. Este hecho sugiere que el sustrato de la renina podría actuar como limitante de la actividad enzimática similar a la renina en el SNC.

97

Efecto cardioestimulante de las prostaglandinas de la serie E en ratas diabéticas

Liliana Canga, Leonor Sterin-Borda, A. L. Gimeno

Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), CONICET, Buenos Aires

Se estudió el efecto inotrópico de la PGE_1 y PGE_2 en aurículas aisladas de ratas normales y diabéticas. La diabetes fue inducida químicamente con estreptozotocina en forma aguda (100 mg/kg) y crónica (65 mg/kg) administrados por la vena de la cola. En el primer caso, los animales fueron sacrificados 3 días después de la inyección y en el segundo, luego de 30 días. La diabetes fue juzgada por el criterio de hiperglucemia (370 $\pm$ 20 mg/100 ml; $n = 20$) comparado con los controles (86 $\pm$ 9 mg/100 ml; $n = 18$). Las ratas diabéticas agudas presentaban cetonuria mientras que en las crónicas los cuerpos cetónicos estaban ausentes en la orina. Las aurículas fueron suspendidas en un medio de Krebs - Ringer - bicarbonato, gaseado con carbógeno y mantenidas a 30° C y a un pH 7.4. En trabajos previos, se ha documentado, mediante curvas dosis-respuesta que la PGE_1, en las aurículas aisladas de ratas normales, produce un efecto inotrópico negativo y que la

PGE_2 presenta una acción bifásica: a bajas concentraciones (10^{-9} a $10^{-7}M$) deprime y a altas (10-6M) estimula la Tensión Contráctil Isométrica (TCI). La acción depresora de ambas prostaglandinas sobre la Tensión Contráctil Isométrica fue atribuida a un efecto inhibitorio presináptico sobre la liberación de norepinefrina (NE) endógena. Por el contrario, en la aurícula aislada de ratas diabéticas, tanto la PGE_2 como la PGE_1, produjeron sólo efecto inotrópico positivo. En las aurículas provenientes de animales diabéticos agudos, el incremento en la Tensión Contráctil Isométrica en % de cambio para PGE_2 ($10^{-7}M$) fue de $\pm$ 62 $\pm$ 8.3, n = 8 y para PGE_1 ($10^{-7}M$) + 22 $\pm$ 3.2, n = 6. Por su parte en las provenientes de animales diabéticos crónicos la PGE_2 ($10^{-7}M$) aumentó la Tensión Contráctil Isométrica en + 45 $\pm$ 2.6, n = 6 y PGE_1 en + 15 $\pm$ 1.3, n = 5. La preincubación con (−)-propranolol ($10^{-7}M$) o la denervación química mediante la inyección intravenosa de 6-hidroxidopamine (16 mg/kg) 24 h antes del sacrificio, inhibieron los efectos inotrópicos positivos de ambas prostaglandinas en las aurículas de animales diabéticos agudos y crónicos. A su vez, dosis subumbrales de NE exógena ($10^{-9}M$) revirtieron el efecto inhibitorio ejercido por (−)-propranolol sobre la acción inotrópica positiva de PGE_1 y PGE_2. Los resultados demuestran: 1) que, en condiciones de diabetes, la influencia de las prostaglandinas de la serie E sobre la aurícula aislada se invierte (de depresora se hace estimulante); 2) el efecto inotrópico positivo de la PGE_1 y PGE_2 es mayor en aurículas provenientes de animales diabéticos agudos que en aquellas provenientes de animales diabéticos agudos que en aquellas provenientes de animales crónicos; 3) el efecto cardioestimulante de las PGE_1 y PGE_2 estaría relacionado con una hiperatividad adrenérgica intrínseca del tejido, como lo demuestra la inhibición producida por el bloqueo adrenérgico y por la denervación química del tejido.

98

Efecto de la castración sobre las vías de inactivación de norepinefrina en el conducto deferente aislado de rata

María del Carmen Agostini, E. Borda, Martha F. Gimeno, A. L. Gimeno

Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), CONICET, Buenos Aires

En trabajos previos se estudió el efecto de norepinefrina (NE) exógena sobre la actividad contráctil del conducto deferente aislado de rata en distintos períodos de maduración sexual, tanto en animales intactos como en castrados. Se demostró que la porción epididimaria (PE) fue más sensible a la NE exógena, que la porción prostática (PP) en ambos grupos experimentales. En todos los casos el efecto de la castración fue revertido por el tratamiento con propionato de testosterona. En el presente trabajo se analizó el efecto de la NE exógena y sus posibles vías de inactivación endógena en la PE y en la PP del conducto deferente proveniente de animales intactos y castrados de 90 días de edad. Para ello se realizaron curvas dosis-respuesta de tipo acumulativo de NE en ambas porciones. En el animal intacto el efecto de NE fue mayor en la PE (dosis umbral $10^{-7}M$: 16.07 $\pm$ 4.27, n = 6; dosis máxima $10^{-5}M$: 96.70 $\pm$ 13.54, n = 6) que en la PP (dosis umbral $10^{-5}M$: 3.24 $\pm$ 0.50, n = 5; dosis máxima $10^{-4}M$: 4.70 $\pm$ 0.80, n = 5). Los resultados están expresados en $mg.mg^{-1}$ de peso húmedo del tejido. La castración desplazó hacia la derecha la curva dosis-respuesta de NE sobre la PE (dosis umbral $10^{-6}M$: 3.88 $\pm$ 0.47, n = 6; dosis máxima $10^{-6}M$: 8.37 $\pm$ 2.05, n = 6; dosis máxima $10^{-5}M$: 22.66 $\pm$ 4.92, n = 5). El bloqueo de la captación neuronal con desmetilimipramina (DMI) ($10^{-7}M$) produjo en la PE del animal normal un desplazamiento hacia la izquierda de la curva dosis-respuesta de la NE exógena (dosis umbral $10^{-8}M$: 11.89 $\pm$ 1.46, n = 5) que fue menor en magnitud que en

el homólogo del animal castrado (dosis umbral 10^{-8}M: 21.43 ± 3.50, n = 5). La potenciación producida por el bloqueo de la captación extraneuronal con normetanefrina (NMN) (10^{-6}M) o el bloqueo de COMT con U-0521 (10^{-6}M) fue similar en los animales intactos y castrados. En la PP la DMI, NMN y el U-0521 potenciaron el efecto de NE en el animal castrado. Los resultados indican: *a*) que el efecto de la NE exógena es mayor en la PE que en la PP del animal intacto; *b*) que la castración ejerce efectos diferentes en ambas porciones: en la PE disminuye el efecto del agonista adrenérgico, mientras que en la PP lo incrementa; *c*) que la inhibición ejercida por la castración sobre los efectos de NE exógena en la PE se encuentra asociada a una exaltación de las vías de inactivación del neurotransmisor y *d*) por el contrario, la potenciación que la castración ejerce sobre los efectos de NE exógena en la PP sería independiente a la magnitud de los mecanismos de inactivación, estando asociada posiblemente a una hipersensibilidad en sitios post-sinápticos de adrenoceptores alfa.

99

Citotoxidad dependiente de anticuerpos en sujetos normales y enfermos con síndromes linfoproliferativos

María A. Goicoa, Luisa Sen, María E. Estévez, R. Diez

Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

La citotoxicidad de mediación celular dependiente de anticuerpos (CCDA) es un proceso citolítico en el cual, células linfoides efectoras no sensibilizadas, destruyen células blanco cubiertas con pequeñas cantidades de anticuerpos, sin la participación del complemento. Las células efectoras (CE), células K (killer), monocitos y granulocitos, se caracterizan por poseer receptores para la porción Fc de la molécula de IgG. A través de este receptor, la CE reconoce y se une al complejo formado por la célula blanco (CB) y los anticuerpos, destruyéndolo. La finalidad de este trabajo fue investigar la capacidad lítica anticuerpo dependiente de células mononucleares de individuos normales y de blastos linfoides y monocitoides utilizando como CB eritrocitos de pollo sensibilizados. El material estudiado se obtuvo de sangre periférica de 12 individuos normales y de sangre periférica o ganglio de cinco pacientes con enfermedades linfoproliferativas correspondiendo: 2 leucemias linfáticas crónicas (LLC), 1 leucemia linfática aguda (LLA), 1 leucemia a células peludas (LCP) y un linfoma de Hodgkin. Las células mononucleares de sangre periférica se obtuvieron de las interfases de los gradientes de Ficoll-Hypaque y las células de los ganglios, por pasaje de los grumos celulares a través de agujas de calibre decreciente. Eritrocitos de pollo (E), marcados por tratamiento con $Na_2{}^{51}CrO_4$ por una hora a 37° C, se incubaron con distintas concentraciones de CE y con antisuero antieritrocitos de pollo (AEP) en diferentes diluciones por distintos períodos de tiempo. Como controles se incubaron en las mismas condiciones: 1) E solamente, 2) E y AEP, 3) E con CE. La liberación máxima de ^{51}Cr se determinó por incubación de los E con agua. El índice de citotoxicidad (IC) se calculó como:

$$IC = \frac{\text{liberación de } ^{51}\text{Cr experimental} - \text{liberación de } ^{51}\text{Cr inespecífica}}{\text{liberación máxima de } ^{51}\text{Cr} - \text{liberación de } ^{51}\text{Cr inespecífica}}$$

Se efectuaron ensayos previos para determinar la concentración óptima de AEP en la sensibilización de la CB. Para ello se utilizaron diluciones decrecientes del AEP desde 10^{-1} a 10^{-5}, estableciéndose que la dilución óptima era de 10^{-4}. Posteriormente se trató de determinar la relación célula efectora a célula blanco (E : B) y el tiempo de incubación óptimos. Se ensayaron tres períodos de incubación, 4, 16 y 20 h observándose que el período óptimo estaba entre 16 y 20 h. Las cuatro E : B utilizadas fueron 6.25 : 1, 12.5 : 1, 25 : 1 y 50 : 1. Los resultados obtenidos fueron, respectivamente: 37.83 ± 13.23, 65.21 ± 11.46, 77.11 ±

5.37 y 79.14 ± 9.32, por lo que se concluyó que las relaciones 25 : 1 y 50 : 1 eran satisfactorias. La incubación de células mononucleares y CB no sensibilizadas en la relación 25 : 1 por 20 h, induce una liberación de ^{51}Cr. (citotoxicidad natural) que oscila entre 0 y 13 % excepto en un caso en el que fue de 59.6 %. Los blastos leucémicos y de linfomas mostraron los siguientes resultados. En el material obtenido de ganglio en una LLC y un linfoma de Hodgkin se observó una gran disminución de la actividad citotóxica (3.3 y 12 %, respectivamente). Con respecto a los blastos de sangre periférica de 1 LLC, 1 LCP y 1 LLA, con receptores para C_3, en la E:B 25 : 1, alcanzaron valores inferiores a los normales, no encontrándose una relación entre la actividad citotóxica y el porcentaje de células con receptores para la porción Fc de la IgG que fue en la LLC del 75 %, en la LCP del 100 % y en la LLA del 0.5 %. Por otro lado en la enfermedad de Hodgkin, mientras los blastos del ganglio mostraron escasa actividad citotóxica, las células de sangre periférica mostraron niveles normales de CCDA. Pero es importante destacar que en este caso, la citotoxicidad natural fue muy alta (50.7 %). Estos datos preliminares sugieren que si bien es necesaria la existencia del receptor para la porción Fc de la IgG para desarrollar CCDA, su sola presencia en la membrana celular no implica actividad citotóxica.

100

Estudio del intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en trabajadores de una industria química

MARCELA GONZÁLEZ CID, ELENA MATOS, EUGENIA S. DE LUSTIG

Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Una serie de sustancias químicas actúa sobre los cromosomas induciendo un aumento del intercambio de cromátidas hermanas (ICH) a dosis que no producen otras alteraciones cromosómicas detectables. En muchos casos existe una relación entre dicho aumento y el poder genotóxico del compuesto, observando algunos autores una correlación linear y positiva entre el ICH y la inducción de mutaciones. Como la mayoría de los carcinógenos conocidos son mutágenos, el detectar un aumento en el número de ICH en individuos expuestos ocupacionalmente a altas dosis de compuestos químicos podría ayudar a delimitar un grupo en riesgo carcinogénico futuro entre los expuestos. El estudio se realizó en cultivos de sangre periférica de 22 trabajadores de una industria que formula pesticidas (especialmente heptacloro, malation y diazinon) y produce curtientes y blanqueadores. Como controles se utilizaron 14 individuos sanos no expuestos. Como el hábito de fumar podría incidir en los resultados por contener el humo de cigarrillo sustancias tóxicas, carcinógenas y promotoras de la carcinogénesis, se analizaron los 2 grupos de individuos en cuanto a dicho hábito. Los cultivos se realizaron en medio F15 con 13 % de suero fetal bovino, 0.5 % de Fitohemaglutinina P, 10 μg/ml de Bromodeoxiuridina y Gentamina durante 72 h en completa oscuridad. Se agregó colchicina durante los últimos 90 min del período de cultivo. Las células se trataron luego 15 min con ClK 0.075 M y se fijaron en metanol/ácido (3 : 1). Posteriormente, las preparaciones cromosómicas se secaron al aire, se colorearon 20 min en la oscuridad con Hoeschst 33258 (1 μg/ml en agua). se expusieron a luz solar 3 h 30 min, se lavaron con agua y se colorearon con Giemsa en 10 % buffer Sorensen, pH 6.8. El promedio de ICH en cada caso se obtuvo a partir de la lectura de 30 metafases. Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente utilizando el test "t" de Student. Los resultados mostraron que el ICH/cél en el grupo expuesto ocupacionalmente tiene un rango de 6.07-10.77 con una media de 7.85 ± 1.15. En el grupo control el rango es de 5.53-11.40 con una media de 8.47 ± 1.64. La diferencia entre ambos grupos no es significativa ($t = 1.33$, $g\ 1 = 34$). Los valores no fueron afectados por la edad ni el sexo. En el grupo expuesto los no fumadores fueron 12 y los fumadores 10, de los cuales 7 fumaban menos de 10 cig/día y los 3 restantes más de 20 cig/día. El promedio de ICH/cél fue: para los no fumadores 7.42 ±

0.86, para los fumadores 8.37 ± 1.29. La diferencia entre fumadores y no fumadores es significativa (t = 2.41, g 1 = 20, $p < 0.05$). En el grupo control los no fumadores fueron 7 y los fumadores también 7, de los cuales 3 fumaban menos de 10 cig/día, 1 fumaba 15 cig/día y 3 más de 20 cig/día. El promedio de ICH/cél en este grupo fue: para los no fumadores 7.98 ± 1.62 y para los fumadores 8.97 ± 1.62. La diferencia entre fumadores v no fumadores no es significativa (t = 1.14, g 1 = 12. Podemos concluir que las sustancias químicas a las cuales estuvieron expuestos los trabajadores no aumentaron el ICH/cél medido en los linfocitos de su sangre periférica. Encontramos que aquellos trabajadores que fuman tienen una media de ICH/cél más alta. No observamos esta diferencia en individuos no expuestos que fuman.

101

Cáncer de mama y dieta

Elena Matos, Norma Sobel, H. Vuoto, Gloria Erbin, C. Albanese, Eugenia S. de Lustig

Instituto de Oncología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

En países con alimentación de tipo occidental se observa una correlación positiva entre algunos componentes de la dieta y el cáncer de mama. Dicha correlación es especialmente intensa cuando se considera la ingesta total de grasas, la de grasas no saturadas y la de proteínas animales. En la Argentina, la incidencia de cáncer de mama en la mujer es muy alta, siendo la primera causa de muerte por cáncer en este sexo. El objetivo de este trabajo es estudiar si existe correlación entre el cáncer de mama y nuestra dieta, e identificar, en caso positivo, los nutrientes más importantes en esta correlación. Entre octubre 1979 y agosto 1981 se estudiaron 193 pacientes con cáncer de mama diagnosticados en el Instituto de Oncología "Angel H. Roffo". Se realizaron entrevistas individuales requiriéndose información sobre datos personales, historia gineco-obstétrica, tratamientos hormonales y hábitos sociales. Para la información sobre dieta se utilizó el método de registro histórico mediante un cuestionario que consideraba 40 tipos de alimentos distintos, su frecuencia de ingestión y forma de cocción, en los últimos 20 años. Los datos concernientes a estadío clínico y clasificación histológica se obtuvieron de la historia clínica. Se utilizaron 2 grupos testigo: uno compuesto por pacientes consanguíneos sanos, y otro por amigas de los casos: mujeres sanas sin historia de cáncer. La información fue procesada por computación. Se establecieron índices de ingestión de grasas o proteínas por alimento y por paciente, que se obtuvieron multiplicando el porcentaje de grasas o proteínas en una porción standard por la frecuencia semanal de consumo. Como primera parte de este trabajo, se efectuó el análisis descriptivo de los casos. Los resultados muestran que la contribución al total de grasas ingeridas es la siguiente, en orden decreciente: carne de vaca: 16,9 %, embutidos de cerdo: 15,4 %, aceites vegetales: 11,9 %. El resto de los alimentos contribuye con menos del 10 %, aportando los quesos duros 5,4 % y la manteca 4,9 %. Con respecto a las proteínas, el 37,8 % proviene de la carne de vaca mientras que la de pollo contribuye con 7,9 % y la de pescado y embutidos de cerdo con el 3,8 % y el 3,7 % respectivamente. Los quesos duros representan el 5,6 % de la ingestión de unidades proteicas. Concluimos que la mayoría de las grasas incorporadas en la dieta de las pacientes estudiadas proviene de la carne de vaca, cerdo y de los aceites vegetales siendo mucho menor el aporte de las grasas por parte de los productos lácteos. En cuanto a las proteínas, la mayoría corresponde a la carne de vaca, mientras que los alimentos restantes aportan menos del 10 % cada uno.

102

Caracterización in vitro de dos adenocarcinomas murinos de diferente capacidad metastatizante

Elisa Bal de Kier Joffé, Lydia Puricelli, M. del Carmen Vidal, Eugenia S. de Lustig

Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El proceso de la metástasis depende de características propias de la célula tumo-

ral y de factores del huésped, Con el objeto de estudiar algunas propiedades de las células metastásicas hemos iniciado una serie de estudios comparativos sobre un adenocarcinoma mamario murino en cepa BALB/c, espontáneo, transplantable y de mediana capacidad metastatizante en pulmón (M3) y una variante obtenida experimentalmente (Colombo y col.) con muy alta incidencia de metástasis pulmonares (MM3). Se han comparado el área celular, las características de crecimiento. el patrón comosómico, las propiedades adhesivas y la producción de fibronectina de estos tumores in vitro. Se empleó un método indirecto para medir el área de las células in vitro (200 células por grupo). Las áreas de las células de M3 presentaron un amplio rango de dispersión, siendo el 50 % de ellas mayores de 800 μm^2. En cambio, los cultivos de MM3 fueron más homogéneos con el 90 % de las células menores de 800 μm^2 y una media de 430 μm^2, que fue significativamente menor que la del tumor parental (986 μm^2). Para estudiar la cinética de crecimiento, se sembraron 3 x 10^4 células de M3 o MM3 por tubo y a distintos días post-siembra se evaluó el contenido proteico de cada muestra. Los cultivos de M3 se duplicaron en 28.8 h y alcanzaron una densidad de saturación de 6.4 x 10^4 células por cm^2 MM3 creció más lentamente, con un tiempo de duplicación 3.6 veces mayor que MM3, alcanzando una densidad de saturación de 2.5 x 10^4 células por cm^2. Se estudió también el patrón cromosómico de cultivos de M3 v MM3 en fase de crecimiento exponencial tratados con Demecolcin, tripsinados y sometidos a hipotonía. Las células del tumor parental M3 presentaron una gran variación en el número cromosómico (15 a 160 cromosomas) con un número modal de 100. Las poblaciones de la variante MM3 fueron más homogéneas para esta característica con el 75 % de las células oscilando alrededor del número diploide (2n = 40). Se ha ensayado también si las células de M3 y MM3 difieren en su capacidad de adhesión a superficie plástica. A los 60 minutos el 66 % de las células de M3 se encuentran adheridas al sustrato mientras que sólo el 44 % de MM3 son adherentes al plástico en el mismo período de tiempo. Hemos estudiado además la expresión de fibronectina (FN) en los cultivos por un método inmunohistoquímico. Se observó que el 75 % de los cultivos primarios de M3 subcutáneo presentaron moderada cantidad de FN que se distribuyó en forma de fibrillas en las zonas de contacto intercelular, mientras que todos los cultivos de MM3 fueron negativos para la expresión de FN. Nuestros resultados muestran que estos tumores difieren in vitro en una serie de propiedades biológicas relevantes al fenómeno de la metástasis. La variante altamente metastatizante MM3, más homogénea en su morfología y cariotipo, crece más lentamente, es menos adhesiva al plástico y no produce FN.

103

Disociación de efectos de pregnanoesteroides en timocitos

Marta B. Castillo, G. Burton, C. P. Lantos, Alicia Roldán

Instituto de Biología y Medicina Experimental y Departamentos de Química Orgánica y de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires

La bien conocida lisis producida por glucocorticoides (GC) en timocitos sería precedida, según muchos, por los siguientes hechos secuenciales: *a*) unión hormona-receptor citosólico; *b*) traslación del complejo al núcleo; *c*) inducción de una proteína específica; *d*) inhibición por ésta de la síntesis de ARN y ADN y proteínas. En un trabajo anterior observamos el efecto inhibidor sobre la incorporación de uridina ^3H al pp. del ácido perclórico de timocitos de rata adrenopriva de los siguientes pregnanoesteroides: cortisol (F), corticosterona, (B), DOC, 11β HO progesterona (HOP) y sus 1: eno derivados (Δ_1). En este trabajo investigamos si la respuesta inhibitoria correlaciona con una disminución en el número de células vivas (que excluyen el azul trypán) después de 8 h de incubación y la competencia por los receptores nucleares de dexametasona (Dex). Hemos observado que a un efecto inhibidor en la incorporación de uridina ^3H por las hormonas GC (F y B)

y sus Δ_1 derivados le correspondió una disminución en el número de células vivas, mientras que estos efectos estarían disociados en los no-GC, no habiendo lisis celular por acción inhibitoria. Los valores de inhibición en la incorporación de uridina ^3H fueron: F 10^{-7}M -23 ± 2 %, Δ_1 F 10^{-7}M $- 37 \pm 3$ %, B 10^{-5}M -43 ± 2 %, Δ_1 B 10^{-5}M -49 ± 4 %, DOC 10^{-4}M -45 ± 3 %, Δ_1 DOC 10^{-4}M -40 ± 4 %, HOP 10^{-4}M -48 ± 1 %, Δ_1 HOP 10^{-4}M 66 ± 2 %. Para esas hormonas, a la misma concentración, el número de células vivas fue de 65 ± 4 %, 43 ± 2 %, 53 ± 4 %, 49 ± 9 %, 110 ± 11 %, 102 ± 6 %, 118 ± 8 %. El desplazamiento de Dex^{3}H 5 x 10^{-8}M por 1, 10, 100, 1000 veces exceso de hormona no radiactiva mostró el siguiente orden: Dex = Δ_1 F > F > B = Δ_1 B > DOC = Δ_1 DOC = HOP: Δ_1 HOP. Estos resultados indicarían que el mecanismo de acción de los pregnanoesteroides no-GC sería diferente al de los GC, a pesar de su intensa capacidad inhibitoria de la síntesis de ARN y no estaría mediado por el receptor de GC.

104

Comportamiento del sarcoma e 1100 en ratas de una sublínea seleccionada para resistencia al desarrollo del S-E 100

G. Celoria, M. T. Font, L. Hinrichsen, M. Morosano

Centro de Biología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

En una línea endocriada de ratas (e), en la que el sarcoma E 100 (S-E 100) produce un 22 % de mortalidad, y en la que se identificaron tres fenotipos: *a*) ratas en las que el S-E 100 no crece (R); *b*) ratas en las que el tumor toma, crece un tiempo variable y regresa (I), y *c*) ratas que mueren por el tumor (S), se realizó la selección divergente de la "capacidad de rechazo" al S-E 100. Se obtuvieron dos sublíneas: e_R, cruzando animales de fenotipo R y e_S, por apareamiento de ratas S; en e_R la letalidad del S-E 100 fue 4 % mientras que en e_S se obtuvo una letalidad del 68 %. El análisis de la F_1 (e_R x e_S) y de la F_2 permitió establecer que el carácter "resistencia" era dominante y que probablemente estaría regido por dos pares de genes independientes, aparentemnte no asociados al MHC, ya que el test de Simonsen fue repetidamente negativo. Se estudió el comportamiento de e_R desafiada con otro tumor, el sarcoma e 1100 para analizar la especificidad de la respuesta a la selección y los resultados se compararon con los de la línea e que se utilizó como testigo. El S-e 1100 se originó espontáneamente en la línea e cuando ésta tenía un coeficiente de endocría de aproximadamente 0.98 y difiere del S-E 100 en el aspecto histológico y en la capacidad de crecimiento. El S-e 1100 se inoculó simultáneamente a ratas e y e_R, por vía subcutánea con trócar y se registraron los porcentajes de tomas, regresiones y muertes y las curvas de crecimiento. La sublínea e_R (n = 32) y la línea e (n = 29) no difirieron en el porcentaje de tomas, que en ambos casos fue 100 %. El porcentaje de regresiones fue mayor ($p < 0.025$) en e_R (68.8 %) que en e (34.5 %) y como consecuencia, la letalidad del S-e 1100 fue también menor ($p < 0.025$). Se analizó el tamaño de los tumores a los 31 días del desafío, resultando menor ($p < 0.01$) en e_R ($\bar{x}$ = 423 mm^2) que en la línea e ($\bar{x}$ = 741 mm^2). Estos resultados señalan que la selección de la capacidad de "rechazo del S-E 100" en la sublínea e_R produjo un incremento en la resistencia al e 1100, que se manifestó por un aumento en el porcentaje de tumores que regresan. Esto permitiría postular que en el modelo de dos pares de gene propuesto, uno de los loci interaccionaría específicamente con el S-E 100 mientras que el otro regiría en forma inespecífica la magnitud de la respuesta inmune a ambos tumores.

105

Efecto del aislamiento de ratones BALB sobre las metástasis de un tumor de mama

J. E. Correa, L. L. Colombo, Yolanda P. de Bonaparte

Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Facultad de Medicina, Buenos Aires

El aislamiento del grupo en ratones, produce alteraciones conductuales asociadas a

modificaciones en las concentraciones de catecolaminas cerebrales; y por otro lado se comporta como un stress que puede incidir sobre el curso de infecciones y sobre la progresión tumoral. Nosotros hemos comunicado previamente que la separación de ratones BALB hembras produce un aumento del peso del bazo leucémico respecto a los ratones agrupados. Se ha documentado respecto a tumores de trasplante, que es el episodio agudo de aislamiento del grupo, el provocador del stress que estimula el crecimiento tumoral, y no el aislamiento en si. El objeto del presente trabajo fue investigar el efecto del aislamiento agudo y prolongado sobre el crecimiento de un tumor de mama murino de pasaje, medido por el tamaño del tumor primario y el número de metástasis pulmonares. Ratones BALB hembra de dos meses y medio de edad, se inocularon sc por trócar, con transplante de tumor M3. Los grupos experimentales incluyeron ratones aislados en jaulas individuales en distintas edades: 1) Al destete, 2) al día 7 p.i. Cada serie estuvo compuesta por 18 animales, integrando tres experimentos, y se comparó con dos series de controles respectivos, de ratones agrupados por seis. Al día 30 todos los animales fueron sacrificados. No se evidenció diferencia estadística entre los grupos de aislados y agrupados, respecto de la latencia, curva de crecimiento, y tamaño del tumor. Sin embargo, sí se observó una menor incidencia de metástasis en el grupo de aislados al destete: Aislados 2/17, Agrupados 11/18, con $p < 0.003$. En el grupo de aislados al día 7 p.i., si bien la incidencia de metástasis no varió (Aislados 6/18, Agrupados 7/18), el número de metástasis fue significativamente menor ($>$ una metástasis/ratón: Aislados 1/6, Agrupados 7/7, $p < 0.003$), así como el tamaño ($>$ 0.5 mm/total de metástasis: Aislados 2/8, Agrupados 27/53, $p < 0.0005$). La esplenomegalia reactiva al crecimiento tumoral fue mayor en el grupo de aislados al día 7 p.i. (peso del bazo: $\bar{x}$ 530 mgrs n 18) que en los agrupados ($\bar{x}$ 400 mgrs, n 18), con < 0.05. Este experimento demuestra que tanto el aislamiento prolongado como el agudo producen alteraciones relativas a los controles, en el número de metástasis, que se oponen al efecto encontrado con otros tumores.

106

Correlación entre menor antigenicidad y mayor poder metastizante en un sistema tumoral murino

L. L. COLOMBO, ISABEL S. D'ELÍA, SLOBODANKA KLEIN, YOLANDA P. DE BONAPARTE

Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Facultad de Medicina, Buenos Aires

Anteriormente se seleccionó in vivo una línea tumoral (M-M3) altamente metastizante a partir de un tumor de mama murino (M3) con baja capacidad de metastatizar. Mientras el tumor M3 original metastatiza en el 60 % de los ratones con un promedio de 6 metástasis por pulmón, la línea M-M3 lo hace en el 100 % de los animales con más de 100 metástasis por pulmón. Con el objeto de establecer una relación entre antigenicidad y capacidad metastatizante, se utilizó el ensayo de aumento del peso del ganglio drenante del sitio de inoculación. Ambos umores (M3 y M-M3), se inocularon por trócar, o con 1×10^6 células tumorales formalinizadas, en la almohadilla plantar de ratones normales BALB/c. A los 5 días se disecaron los ganglios poplíteos, bajo microscopio estereoscópico, y se pesaron con una precisión de 0.1 mg; como controles se pesaron ganglios poplíteos de ratones normales. Además para estudiar la capacidad de reconocimiento a los antígenos tumorales, 1.5×10^6 linfocitos de los ganglios poplíteos de los ratones estudiados y de los ratones normales, fueron co-inoculados con 75 μg del estracto antigénico de cada tumor. Se evaluó la respuesta de hipersensibilidad retardada por engrosamiento de la almohadilla plantar 24 h post-inóculo. El extracto antigénico se obtuvo por homogeneización del tejido tumoral en PBS, deslipidización con cloroformo, y centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos a 4° C, determinándose la concentración de proteínas por el método de Lowry. La suspensión de células tumorales obtenida con pronasa-DNAsa, fueron formalinazadas según técnica de Ross. Resultados de los pesos de los ganglios poplíteos de los animales inoculados con: A) M3 con trócar: 3.3 ± 0.4 mg (n: 8); B) células formalinizadas de M3: 4.0 ± 0.2 mg (n: 15); C) M-M3 con tró-

car: 2.3 ± 0.3 mg (n: 8); D) células formalinizadas de M-M3: 3.1 ± 0.3 mg (n: 15); E) normales sin tratamiento: 1.5 ± 0.06 (n: 20). Existen diferencias en el peso de los ganglios poplíteos de los animales inoculados con tumor M3 con respecto a los inoculados con tumor M-M3 ($p < 0.03$), pero no se observaron diferencias entre células viables y formalinizadas del mismo tumor. La transferencia local adoptiva de hipersensibilidad retardada fue positiva para ambos tumores, independientemente del tipo de sensibilización. El engrosamiento de la almohadilla plantar fue: 1) para el tumor M3: 0.28 ± 0.02 mm; 2) para el tumor M-M3: 0.27 ± 0.02 mm; 3) para los controles: 0.13 ± 0.02 mm. Cada grupo consistió de 10 animales. Los resultados sugieren que ambos tumores son antigénicos, aunque la línea seleccionada altamente metastatizante (M-M3) lo es en un grado menor que el tumor original (M3), lo que podría favorecer el crecimiento de las metástasis, y que ambos tumores son capaces de provocar una respuesta inmune en el huésped (demostrada por el test de transferencia local adoptiva), aunque éste no pueda defenderse de sus metástasis.

107

Inducción de intercambio de cromátides hermanas (ICH) en células de riñón de ratón expuestas a acetato de medroxiprogesterona

J. Herrera, J. García Heras, Mercedes Lovell, Irma Coco, R. Coco

Laboratorio de Citogenética, Centro de Investigaciones Endocrinológicas, División Endocrinología, Hospital de Niños, Buenos Aires

El acetato de medroxiprogesterona es un progestágeno de uso terapéutico extendido en el ser humano y del que poco se conoce acerca de su mutagenicidad. Por otro lado, es bien conocida la utilización de cultivos de células para evaluar la acción mutagénica de compuestos a nivel citogenético y molecular. Debido a que el ICH puede ser inducido por dosis subtóxicas de carcinógenos y mutágenos, su análisis ofrece una rápida y sensible evaluación de daño genético. El propósito de este trabajo es evaluar la acción del acetato de medroxiprogesterona (Depo-Provera, Upjohn Co) sobre el ICH en el sistema in vitro de células de riñón de ratón C3H en su forma de presentación comercial (diluida en agua) y previamente disuelta el alcohol etílico. El test fue realizado en células de riñón de ratón C3H cultivadas en MEM con 15 % de suero fetal bovino. Cinco mililitros de una suspensión celular (100 células/ml) fueron sembradas en frascos de 25 cm² de superficie adherente y se dejaron adherir durante 12 horas. Posteriormente se ensayaron las dosis de 0.1, 1, 10 y 100 μg/ml de Depo-Provera diluida en agua. Las dosis de 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 100 μg/ml de Depo-Provera disuelta en alcohol etílico. Se realizaron controles con el agregado de alcohol etílico y sin el solvente y un control positivo con el agregado de adriamicina (0.04 μg/ml durante 1 hora). A todos los frascos se les agregó bromo-desoxiuridina (10 μg/ml), se cultivaron durante 44 horas a 37 grados centígrados, siendo tratados con colchicina las últimas 4 horas (0.1 μg/ml). El sacrificio de los cultivos, la obtención de las preparaciones cromosómicas y la coloración diferencial entre cromátides hermanas se realizaron con las técnicas habituales. Se analizaron a ciegas 25 metafases en segunda división del tratamiento experimental con Depo-Provera diluida en agua, 50 metafases del tratamiento con adriablastina y 75 metafases de los tratamientos restantes. La frecuencia media de ICH por cromosoma correspondiente a cada tratamiento son los siguientes: Control: 0.285 ± 0.069; Control con alcohol etílico: 0.316 ± 0.115; Control positivo: 0.606 ± 0.186; Depo-Provera diluida en agua 0.1 μg/ml: 0.260 ± 0.097, μg/ml: 0.272 ± 0.0122, 10 μg/ml. 0.266 ± 0.109, 100 μg/ml: 0.280 ± 0.196; Depo-Provera disuelta en alcohol 5 μg/ml: 0.317 ± 0.097, 10 μg/ml: 0.472 ± 0.155, 20 μg/ml: 0.603 ± 0.210, dosis mayores sin metafases (efecto tóxico). Varios autores han comunicado la utilidad del ICH en células cultivadas in vitro (con o sin el agregado de sistemas activadores) tratadas con sustancias químicas de reconocida mutagenicidad. La evaluación del acetato de medroxiprogesterona diluida en agua dio resultado negativo, pero disuelta previamente en alcohol etílico resultó ser

una potente inductora de ICH, con una respuesta dependiente de la dosis. Antes de emitir conclusiones definitivas con este sistema, es conveniente evaluar separadamente a la hormona de su vehículo que contiene polietilenglicol 4000, polisorbato 80, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de sodio y agua. Sin embargo, cabe consignar que la positividad de los resultados en las condiciones realizadas concuerdan con los obtenidos in vivo en el sistema conejo realizado previamente en nuestro laboratorio (García Heras & Coco, 1981).

108

Caracterización de un clon de genoma porcino que codifica para un antígeno mayor de histocompatibilidad

D. S. Singer, D. Camerini-Otero, M. L. Satz, B. Osborne, L. D. Abelson, D. Sachs, S. Rudikoff

Immunology Branch and Laboratory of Cell Biology, National Cancer Institute and Genetics and Biochemistry Branch, NIAMDDK, NIH, Bethesda, MD., U.S.A.

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en el hombre (HLA) y en otros vertebrados superiores es un locus genético muy polimórfico que regula la expresión de los clásicos antígenos de transplante y otras glicoproteínas que intervienen en la regulación de la respuesta inmune. Mediante el uso de un clon de HLA-cDNA humano hemos aislado un clon de genoma porcino que codifica para la cadena pesada de un antígeno mayor de transplante. Se prepararon 1.6×10^5 fagos recombinantes de la cepa Charon 4A, cada uno conteniendo un fragmento de 20 Kb de DNA extraído de hígado porcino del haplotipo *d*. Luego de la infección de bacterias, se identificó y aisló un clon cuyo DNA hibridizó con un "probe" ^{32}P-HLA-cDNA. Se caracterizó a este clon (PD1) mediante el uso de enzimas de restricción: la longitud del DNA eucariótico insertado es de ~ 17.7 Kb; las secuencias homólogas que hibridizan con el HLA-cDNA mapean en extremo derecho a ~ 3.8 Kb del sitio de inserción y su longitud es de ~ 2.6 Kb. Con el objeto de identificar el/los productos codificados por el segmento clonado de genoma porcino, se co-transformaron fibroblastos L de ratón (H-2^k) (deficientes en el gen de timidina kinasa, TK), con el gen de TK purificado de virus *Herpes simplex* y con PD1. Se aislaron en medio selectivo HAT, dos líneas celulares transformadas, en las cuales se estudió la presencia y expresión de secuencias de DNA del MHC porcino. Como control se estudió una línea celular transformada sólo con el gen TK. La presencia de secuencias de PD1 en estas células se demostró por hibridización con el probe ^{32}P-HLA-cDNA bajo condiciones tales en que sólo existe mínima hibridización con el genoma murino: se encontró una única banda intensa en el DNA de las dos líneas transformadas, ausente en la línea control. Utilizando enzimas de restricción se generaron bandas que coinciden con aquellas obtenidas al digerir PD1 con cada enzima. También se estudió la expresión de antígenos de transplante por estas células. Las tres líneas celulares fueron susceptibles a la lisis mediada por un aloantisuero de ratón anti-H-2^k y por un suero porcino anti-ratón y complemento. Pero sólo las dos líneas transformadas fueron susceptibles a dos aloantisueros porcinos distintos dirigidos contra el haplotipo *d*. Además, la absorción de uno de los aloantisueros con linfocitos porcinos de la cepa *d*, eliminó su reactividad sobre las células transformadas, reactividad no absorbida con linfocitos de otra cepa. Por otro lado, se demostró la presencia de proteínas de peso molecular 45.000 d en geles bidimensionales de inmunoprecipitados de lisados de células transformadas marcadas con ^{35}S-metionina. Estas cadenas no aparecieron en los lisados de las células controles, ni tampoco cuando se utilizó un aloantisuero porcino anti-haplotipo *c*. También se identificó en los geles la presencia de b_2-microglobulina de ratón, demostrando que la cadena pesada del antígeno de transplante porcino es capaz de asociarse con la cadena liviana heteróloga y de insertarse en la membrana celular. El clon PD1 puede ser utilizado para estudiar secuencias y organización del MHC porcino y su relación evolutiva con otras especies.

109

Desplazamiento de la tirotrofina (TSH) por la inmunoglobulina (Ig) estimuladora de la tiroides en pacientes con enfermedad de Graves. Ensayo de radio-receptor

R. J. Boado, E. R. Ulloa, A. A. Zaninovich

Laboratorio de Investigaciones Endocrinológicas, CONICET, Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas José de San Martín y Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires

Es conocida la existencia en el suero de pacientes con enfermedad de Graves de un estimulador anormal de la tiroides, habiendo sido identificado como una Ig, conocida anteriormente por estimular en forma lenta la tiroides de ratón (LATS). El presente trabajo estudió un grupo de 9 pacientes con enfermedad de Graves, antes y 30 días después de comenzar el tratamiento con drogas antitiroideas o con ^{131}I y 20 sujetos normales. Se midió la Ig sérica por el método de desplazamiento de la TSH marcada, de sus receptores de membrana tiroidea (TDI). El objeto del estudio fue metodológico y clínico-terapéutico, ya que se trató de determinar si el ensayo de radio-receptor admite el uso de TSH bovina (bTSH) purificada por métodos convencionales (columna de Sephadex) y evitar así el largo y complejo proceso de purificación con receptores de membrana tiroidea humana. La fracción de Igs de cada paciente se precipitó con sulfato de amonio, se dializó contra buffer TRIS y se ajustó a una concentración de 20 mg/ml previa lectura en espectrofotómetro a 280 nm. La bTSH muy purificada (30 U/mg), cedida por el Dr. Pierce (Univ. de California, USA), se marcó con ^{125}I por el método de lactoperoxidasa. El producto de marcación se purificó con membranas de tiroides humana (pellet de 15 000 × g) obtenidas de cirugía. La ^{125}I-bTSH unida a membranas se separó de las mismas con una solución de ClNa 2 M (0.1 % BSA) y ultracentrifugación 120 000 × g), pasándose luego por una columna de Sephadex G-100 en cámara fría por 12 horas. El ensayo de radio-receptor se realizó con 4 mg de Ig de cada paciente, membranas equivalentes a 25 mg de glándula tiroides y aproximadamente 10 000 cpm de ^{125}I-bTSH purificada por receptores. También se realizó un ensayo de desplazamiento con bTSH fría (Sigma Co). La fracción libre de ^{125}I-bTSH de la unida a receptores se separó por centrifugación a 15 000 × g. Los resultados se expresaron de acuerdo al siguiente índice: 100– (% unión suero paciente) × 100/($\bar{x}$ % unión suero control), considerándose positivo, para el ensayo los índices mayores de 30. Al iniciar el tratamiento el 56 % de los pacientes hipertiroideos tenían un índice positivo, es decir tenían niveles séricos elevados de TDI. Luego de 30 días de tratamiento con metimazole o con ^{131}I el 50 % de los enfermos mejoró clínicamente coincidiendo con una reducción del índice de TDI de un 30-40 % del valor previo al tratamiento. En estos sueros se determinó también el TDI usando ^{125}I-bTSH purificada por columna de Sephadex G-75 solamente (y no a través de receptores de membrana). Se observó que la unión específica de esta TSH a sus receptores fue sólo del 2 % (purificada por receptores la unión es del 15-20 %), lo que indica que la ^{125}I-bTSH debe ser purificada con sus receptores para la validez del método. En conclusión, la determinación de la Ig presente en estos pacientes por el método de receptores de membrana, aunque complejo y prolongado, es un parámetro de mucha utilidad en el estudio de la fisiopatología de la enfermedad de Graves.

110

Eferencias neuroendocrinas del ganglio cervical superior. Efectos de la LH sobre el receptor muscarínico ganglionar

P. V. Gejman, D. P. Cardinali

Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), Buenos Aires

El ganglio cervical superior (GCS) pertenece al grupo de estructuras denominadas "efectores hormonales", debido a que posee la propiedad de modificar su metabolismo en respuesta a señales endocrinas.

Las neuronas simpáticas noradrenérgicas del GCS reciben mensajes transinápticos mediados por la acetilcolina, cuya interacción con receptores muscarínicos determina la producción de potenciales postsinápticos de tipo lento. Puesto que en trabajos previos de este laboratorio se había demostrado que la LH afecta el metabolismo de la norepinefrina en el territorio ganglionar, se decidió investigar el efecto de la hormona sobre el receptor muscarínico del GCS bovino y de la rata, utilizándose el ^{3}H-quinuclinidil benzilato (^{3}H-QNB) como marcador de dichos receptores. Fueron realizados estudios in vivo (GCS de rata) e in vitro (GCS bovino). En el primer caso, ratas macho, Wistar (180-200 g) fueron castradas entre las 15 y 16 PM e inyectadas con 100 μg de LH ovina (NIH-LH-S 19) o con vehículo (2 ml de ClNa 0.9 %, sc) 3 y 18 h después de la operación y muertas 3 h más tarde, y removidos ambos ganglios y procesados. En el caso de los experimentos in vitro los ganglios fueron extraídos entre 15 y 20 min luego del sacrificio y seccionados en cubitos (2-3 mm de lado) e incubados a 30° C durante 30 min en medios isosmóticos. En esta condición fue estudiado el efecto de la LH (10^{-7} M) y del K^{+} en altas concentraciones (80 mM, 5 minutos). El ensayo del receptor fue efectuado en fracciones crudas de membrana, siendo utilizado el método de filtración rápida en Whatman GFB. La unión específica del ^{3}H-QNB fue definida como aquella susceptible de desplazamiento por atropina (0.2 μM), siendo ésta siempre mayor que el 75 % de la unión total. En el GCS bovino se verificó la presencia de una unión específica de alta afinidad y suturable del ^{3}H-QNB. El estudio de Scatchard indicó la presencia de una sola población de sitios de unión con una cantidad máxima de 94 fmoles/mg de proteínas (Bmax) y una constante de disociación (Kd) de 149 x 10^{-10} M. La unión máxima detectada se observó después de una incubación de 45 m a 30° C. La despolarización inducida por el K^{+} no modificó ninguno de los parámetros. En cambio, el tratamiento hormonal, tanto in vivo como in vitro, disminuyó la Bmax sin afectar el Kd (Bmax expresada como fmoles/mg de proteínas): in vivo –GCS de rata– control: 134 $\pm$ 0.8, LH: 82 $\pm$ 11; in vitro –GCS bovino– control: 107 $\pm$ 6.6, LH: 86.6 $\pm$ 6.1 : control + K^{+} : 116.3 $\pm$ 5.3, LH + K^{+} : 85.1 $\pm$ 4.4, $p < 0.05$ en las tres comparaciones, Student's test. Cuando homogenatos libres de tratamiento previo fueron incubados en presencia de la hormona o de vehículo no se observaron diferencias. El tratamiento con K^{+} no modificó el efecto de la LH. Conclusiones: 1) los efectos de la LH sobre el receptor muscarínico, in vivo e in vitro, sugieren una función reguladora de la hormona de la actividad colinérgica ganglionar; 2) dicho efecto no es directo sobre las membranas, sino que requiere de la estructura celular para expresarse, y 3) la ocupación del receptor por el agonista endógeno no modificó los sitios de unión específicos del ^{3}H-QNB ni tampoco el efecto de la hormona. Esta última evidencia sugiere un sitio de acción post-sináptico de la LH.

111

Autorregulación tiroidea: papel de la triyodotironina y de la tiroxina

M. A. PISAREV, G. J. JUVENAL, DIANA L. KLEIMAN DE PISAREV, G. D. CHAZENBALK

División Bioquímica Nuclear, Centro Atómico Ezeiza y Departamento Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que el yoduro de potasio inhibe la biosíntesis de proteínas y RNA en tiroides bovina, in vitro y la producción de bocio en el ratón. Esta acción del yoduro es mediada por un compuesto orgánico e intracelular, ya que el perclorato y el metilmercaptoimidazol bloquean este efecto. Las yodotironinas, triyodotironina (T 3) y tiroxina (T 4) son los principales compuestos yodados intratiroideos conocidos con actividad biológica. Tanto la T 3 como la T 4 reprodujeron la acción inhibitoria del yoduro, lo que nos llevó a postular que son las mediadoras de la acción del mismo, constituyendo un sistema supercorto de regulación. Los presentes estudios tuvieron como objeto caracterizar este sistema autorregulatorio tiroideo. La acción

inhibitoria de T 3(10^{-6}M) no fue alterada por la adición a la incubación de metilmercaptoimidazol o de propiltiouracilo. Por otra parte la incubación con ^{125}I-T 3 permitió demostrar que la hormona no es deshalogenada significativamente bajo estas condiciones. La T 3 penetra a la célula tiroidea por un mecanismo específico, temperatura dependiente (mayor a 37° C). Dosis progresivas de T 3(10^{-9} a 10^{-5} M) inhibieron progresivamente la captación de T 3 marcada por la célula tiroidea. Otros compuestos yodados no tuvieron efecto. La acción tiroides/medio llegó a valores de 10-12 a los 90 min. Tanto actinomicina D como cicloheximida la aumentaron significativamente. Al analizar la distribución subcelular se demostró que la hormona se localiza específicamente en el núcleo de la célula, ya que el agregado de T 3 fría a los cortes la desplaza. Se estudió la característica de la unión de T 3-^{125}I a núcleos purificados, demostrándose proporcionalidad con cantidades crecientes de núcleos, así como saturación con el tiempo. En experimentos preliminares se solubilizó el complejo hormona-receptor con ClK 0.4 M. Se compararon las extracciones realizadas con diferentes soluciones y temperaturas. El complejo hormona-receptor fue separado de la hormona libre mediante cromatografía en columna con Sephadex G-25. La T 4 también inhibe la síntesis de proteínas v RNA tiroideos y esta acción no es alterada por la adición de metilmercaptoimidazol o propiltiouracilo. La metabolización de T4-^{125}I fue analizada mediante cromatografía en papel con 3 sistemas de solventes. La T 4 sufre la transformación a T 3 y a T 3 reversa. La incubación de los cortes con TSH aumentó significativamente esta transformación. El ácido iopanoico el PTU y el MMI no la afectaron. La T 4 se localiza específicamente en el núcleo, siendo desplazada por hormona fría (T 4) pero no por T 3. La cromatografía de los núcleos mostró que 60 % de la radiactividad corresponde a T 4 y un 10 % a T 3. Cuando los cortes de tiroides se incubaron con ^{125}I se demostró la presencia de T 4 y T 3 marcadas en el núcleo. En conclusión: la T 3 y T 4 tienen una acción inhibitoria directa sobre la tiroides. Ambas tienen una localización específica en el núcleo celular. Para este mecanismo autorregulatorio la T 3 se origina de la hormona circulante, de la biosíntesis a partir del yodo y de la deshalogenación de T 4. Esta última se origina por los primeros mecanismos.

112

Mecanismo de acción hormonal I: Factores esteroidogénicos ACTH dependientes y estimulación de la síntesis de esteroides en mitocondria de célula de Leydig

E. J. Podestá, R. Neher, Angela Rosaria Solano

C.E.D.I.E., Hospital de Niños, Buenos Aires y F.M.I., Basilea, Suiza

Está bien establecido que la esteroidogénesis está regulada por hormonas en un mecanismo complejo donde intervienen procesos de fosforilación y síntesis proteica. Sin embargo, la función de proteínas fosforiladas así como la relación entre la activación citoplasmática y el efecto mitocondrial son aún desconocidos. Esto es debido a la falta de un ensayo in vitro capaz de medir la actividad de macromoléculas intracelulares que no pueden ser introducidas en tejidos o células intactas. Se describe un ensayo de recombinación in vitro usando fracciones subcelulares post-mitocondriales de adrenales estimuladas con ACTH (PMTA) y mitocondrias aisladas (MT) de tejido sin estímulo. PMTS produce un incremento de 10 a 100 veces en la neosíntesis de pregnenolona en MT (7790 pg/0.04 adrenal) en comparación a fracciones subcelulares post-mitocondriales de tejido no estimulado (100 pg/0.04 adrenal). Este incremento es semejante al que se produce en mitocondrias de adrenales estimuladas in vivo con ACTH. NADPH o colesterol libre no inhiben la capacidad esteroidogénica de PMTA y no estimulan por sí solos. Esta estimulación se observa también usando células de adrenal aisladas y células de tumor de adrenal y mutantes en cultivo estimuladas con AMP cíclico (AMP). Estos resultados sugieren la participación del sistema AMPc-Proteína quinasa AMPc dependiente en la formación de los factores esteroidogénicos en PMTA. Cuando se reemplazan las mitocondrias de adrenal por mitocondrias obtenidas de células de Leydig aisla-

das de testículo de rata adulta, los factores esteroidogénicos ACTH dependientes son también capaces de actuar en mitocondrias de célula de Leydig estimulando la producción de pregnenolona. Esto no se observa con MT de tejidos no esteroidogénicos. El desarrollo del ensayo de recombinación in vitro permitirá el estudio de eventos intracelulares asociados con la activación de la neosíntesis de pregnenolona en mitocondria.

113

Mecanismo de acción hormonal II: Compartamentalización de factores post-translacionales ACTH-AMP cíclico dependientes en la estimulación de la biosíntesis de esteroides

Angela Rosaria Solano, R. Neher, E. J. Podestá

C.E.D.I.E. Hospital de Niños, Buenos Aires y F.M.I., Basilea, Suiza

En los eventos intracelulares que regulan la biosíntesis de esteroides luego de la activación de la proteína quinasa AMP cíclico dependiente y la consecuente fosforilación de proteínas, el desarrollo de un ensayo de recombinación in vitro permitió observar que ACTH produce factor(es) esteroidogénicos que se encuentran en el sobrenadante post-mitocondrial y que son capaces de activar la neosíntesis de pregnenolona-progesterona en mitocondrias aisladas. El objeto del presente trabajo es estudiar la naturaleza del factor(es) presentes en el homogenato crudo post-mitocondrial dado que su caracterización permitirá relacionar el evento regulador citosólico y su efecto sobre la biosíntesis de esteroides en mitocondrias. Pellets de 700 x g (NP) y 105 000 x g (MP) y el sobrenadante de 105 000 x g (CS) de adrenales de ratas no tratadas o previamente tratadas con ACTH (30 μg/rata) (NPA, MPA, CSA) fueron recombinadas con mitocondrias de adrenales no estimuladas. NP, MP y CS producen 115, 95 y 36 pg de progesterona/0.04 adrenal y NPA, MPA y CSA producen 1390, 1070 y 1190 pg de progesterona/0.04 adrenal, respectivamente. La estimulación de 10 veces se incrementa a 100-150 veces cuando se recombinan las fracciones entre ellas: MPA + NPA = 10 440 pg de progesterona/0.04 adrenal, MPA + NAP + CSA = 17 800 pg de progesterona/0.04 adrenal. Estos valores son comparables a los pg de progesterona producidos por mitocondrias de adrenal estimuladas al máximo por ACTH in vivo. El hallazgo de un gran sinergismo entre diferentes fracciones subcelulares sugiere la presencia de más de un factor esteroidogénico. La existencia de diferentes factores posiblemente asociada a diferentes compartimientos, fue corroborada cuando se hizo recombinación de fracciones subcelulares activadas y no activadas: MPA + NPA + CS = 14 260 pg de progesterona/0.04 adrenal, CSA + MP + NP = 11 070 pg de progesterona/0.04 adrenal, sugiriendo la presencia de una cascada en la formación de factores esteroidogénicos hormono - dependientes: ACTH → CSA → MP + NP → MPA + NPA → CS → mitocondrias → pregnenolona-progesterona. Un factor ACTH-AMP cíclico dependiente en CSA estimularía la transformación de MP-NP y esta transformación produciría la activación de CS para dar lugar a la interacción y estimulación mitocondrial. Cicloheximida antes de ACTH previene la formación de dichos factores, mientras que cicloheximida no tiene efecto in vitro. El hallazgo de un gran sinergismo entre diferentes fracciones subcelulares y la posibilidad de su detección en un ensayo de recombinación in vitro abre un gran campo en el estudio de eventos intracelulares en la regulación de la síntesis de esteroides.

114

Mecanismo de acción hormonal III: cascada de eventos post-translacionales ACTH-AMP cíclico dependientes en la estimulación de la esteroidogénesis

Angela Rosaria Solano, R. Neher, E. J. Podestá

C.E.D.I.E. Hospital de Niños, Buenos Aires y F.M.I., Basilea Suiza

En el mecanismo de acción hormonal para la regulación de la síntesis de esteroides, procesos de fosforilación y síntesis proteica interactúan para dar lugar a la activación intramitocondrial de la ruptura

de la cadena lateral del colesterol. Los procesos que relacionan una activación citoplasmática y el efecto mitocondrial son probablemente regulados por factores que actuando sinergísticamente, señalan la presencia de una cascada de eventos post-translacionales iniciados en el citoplasma. La existencia de una cascada post-translacional crea la necesidad de producir in vitro, a partir del factor inicial de activación ACTH dependiente, la secuencia de eventos para cada factor individual, permitiendo la caracterización y aislamiento de cada uno de estos factores. Se describe un ensayo de activación in vitro que demuestra la presencia de por lo menos cuatro factores, confirmando una cascada post-translacional. Sobrenadantes de 105 000 xg de adrenales estimuladas con ACTH (CSA) son capaces de transformar los pellets de 700 x g (NP) y 105 000 x g (MP) de adrenales no estimuladas, de inactivos en activos para producir la neosíntesis de pregnenolona-progesterona en mitocondrias de adrenales no estimuladas. MP + NP activado in vitro por CSA produce 2270 pg de progesterona/0.04 adrenal en comparación con 10 pg de progesterona/0.04 adrenal cuando son incubados con citosol de adrenal no estimulada (CS). A su vez los pellets de 700 x g y 105 000 x g de adrenales estimuladas con ACTH (NPA + MPA) son capaces de activar CS produciendo 9200 pg de progesterona/0.04 adrenal cuando es incubado con NP + MP. Estos resultados sugieren la presencia de los siguientes factores: ACTH → AMPc → P.K. → F_1 + CS → CSA → F_2 + MP + NP → F_3 + CS → F_4 → mitocondrias → pregnenolona-progesterona. CSA no es capaz de iniciar la cascada cuando proviene de adrenales inhibidas con cicloheximida previa a la estimulación con ACTH, confirmando el carácter post-translacional de la misma. El sustrato de F_3 (en CS) es también cicloheximida sensible. F_2 es tripsina sensible. La caracterización de los sustratos y factores activos permitirá un gran avance en el entendimiento de los eventos entre la activación citoplasmática y el efecto mitocondrial regulado hormonalmente.

115

Respuesta de la globulina ligadora de hormonas sexuales al estímulo con hCG en niños

Alicia Belgorosky, M. A. Rivarola

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños, Buenos Aires

La globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG) del suero humano es estimulada por estrógenos e inhibida por andrógenos. Los niveles en los varones prepuberales son más altos que en los adultos y este descenso es probablemente productivo por el aumento de la testosterona. El test de estimulación con hCG es utilizado habitualmente para conocer la capacidad de respuesta de las células de Leydig prepuberales. El propósito de este trabajo fue estudiar si esta estimulación podría ser usada al mismo tiempo para evaluar la respuesta biológica a los andrógenos mediante la determinación de los niveles de SHBG en niños. Se administraron 1000 UI de hCG diarios durante 5 días y se midieron los niveles de andrógenos plasmáticos (17-OH-C_{19}) y SHBG antes y después del estímulo. En 11 pacientes con criptorquídea la SHBG bajó de 106.6 ± 48 a 57.3 ± 33.1 nmoles/l, 54 ± 17 % del valor basal (media ± SD) mientras que los 17-OH-C_{19} subieron de 47.9 ± 19.4 a 342 ± 253 ng/dl. En 6 pacientes con anorquia no hubo cambios en ninguna de las dos determinaciones. Cuatro de 5 pacientes con pseudohermafroditismo masculino tuvieron una elevación normal en los 17-OH-C_{19} pero sólo 3 de ellos disminuyeron la SHBG significativamente (109, 33.7, 73.9, 48.3 % del nivel basal). Cinco pacientes con micropene incrementaron los 17-OH-C_{19} de 39.2 ± 15.7 a 398 ± 205 ng/dl pero no disminuyeron la SHBG, pre 81.6 ± 40.1 y post 89.2 ± 42 nmoles/l. En 3 pacientes con anorquía, la administración de testosterona exógena disminuyó, a los 6 días, los niveles de SHBG a 64, 60 y 42 % del valor basal. Se concluye que la respuesta del SHBG a la hCG o a la testosterona puede ser usada como una prueba útil y práctica para el diagnóstico de insensibilidad a los andrógenos en niños.

116

Recuperación de la función tiroidea en niñas y adolescentes hipotiroideas con tiroiditis linfocitaria crónica (TLC)

LAURA GRUÑEIRO DE PAPENDIECK, SONIA IORGANSKY, M. A. RIVAROLA, C. BERGADÁ

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños, Buenos Aires

Se estudiaron 10 niñas con diagnóstico de TLC, hecho de acuerdo a los criterios de Fisher, cuyas edades oscilaron entre 6 11/12 y 13 11/12 años que inicialmente se presentaron con un cuadro de hipotiroidismo manifiesto con valores elevados de tirotrofina sérica (TSH) (entre 20 y 160 μU/ml) y valores subnormales de tiroxina (T_4) ($\bar{x} \pm$ DS = 2.83 $\pm$ 1.17 μg/dl). Ocho de ellas fueron revaloradas después de 3/12 a 4 7/12 años, luego de un mes de suspensión de la terapia con levotiroxina, las dos restantes no recibieron medicación. Se hallaron valores de TSH y T_4 dentro del eutiroidismo: TSH ($\bar{x} \pm$ DS) = 2.36 $\pm$ 1.15 μU/ml y T_4 = 8.6 = 1.73 μg/dl. Se estudió además en seis pacientes revaloradas, la respuesta de TSH a la hormona liberadora hipotalámica de TSH (TRH). El máximo incremento de TSH post TRH (Δ mx) en un grupo control fue de 10.8 $\pm$ 4.26 μU/ml, un Δ mx por encima de 2 DS fue considerada respuesta exagerada. En dos pacientes se halló respuesta normal, Δ mx = 8.15 $\pm$ 0.49 μU/ml y en las otras cuatro, exagerada, Δ mx = 27.92 $\pm$ 8.83 μU/ml. El hipotiroidismo que presentan estas pacientes sería debido a la predominancia de anticuerpos bloqueadores y no citotóxicos que producirían una inhibición de la función y no destruirían las células haciendo posible su recuperación. Por otra parte, la respuesta exagerada al TRH observado en algunas pacientes eutiroideas con TSH y T_4 normal, evidenciaría una deficiencia funcional latente. La TLC en niños y adolescentes sería un proceso autolimitante, reversible que puede llevar a la recuperación de la función.

117

Estudio de algunas propiedades biomecánicas del hueso de rata y de su relación con la función paratiroidea

E. IRIARTE, A. CARBONÉ, E. AUDISIO, C. DELGADO, R. TESSARO, C. GALASSI, R. GAZZOLA, NORA GARCÍA, J. L. FERRETTI

Cátedra de Biología I-II, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional de Rosario

Los fémures enteros de ambos lados de 6 grupos de ratas sometidas desde los 40 a los 200 días de edad a dietas control (Ca = 1 % como PO_4HCa, n = 26), hipocálcica (↓CaD, Ca = 0.01 %, n = 6), hipercálcica (↑CaD, Ca = 2 %, n = 6), o con carbonato (Ca = 1 %, n = 6) o gluconato (Ca = 1 %, n = 6) en lugar de fosfato; o a tiroparatiroidectomía previa (TPTX; dieta control, n = 6), fueron objeto de un ensayo de flexión en fresco, utilizando un aparato de diseño original, que posibilitó el registro gráfico de la curva de tensión/deformación bajo peso uniformemente creciente (1 kg/min) en condiciones geométricamente constantes, desde carga cero hasta el punto de fractura. El análisis de las curvas y la morfometría de las secciones rectificadas de los huesos permitieron estimar el módulo de elasticidad (E, MN/m^2) del material y la cantidad de energía absorbida ($N.mm/cm^3$) por el sector de la pieza comprendido entre apoyos, en total hasta la ruptura (EAt) o durante el período de comportamiento elástico (EAel). La relación pared/luz de la sección, la EAel y el cociente porcentual EAel/EAt aumentaron significativamente con el tratamiento con gluconato (0.69 $\pm$ 0.06; 73.1 $\pm$ 6.8; 69.1 $\pm$ 14.2) ($\bar{x} \pm$ DS), con la ↑CaD (0.77 $\pm$ 0.04; 69 $\pm$ 10.3; 61.7 $\pm$ 19.5) y con la TPTX (0.94 $\pm$ 0.21; 92.5 $\pm$ 18.1; 77.5 $\pm$ 21.2) respecto de los controles (0.61 $\pm$ 0.06; 53.1 $\pm$ 10.2; 37.3 $\pm$ 6.3) y de los tratados con ↓CaD (0.5 = 0.01; 51.6 $\pm$ 14.4; 42.5 $\pm$ 9.0). La EAt y el módulo de elasticidad no variaron con los tratamientos dietarios. El módulo aumento por la TPTX y con la ↑CaD, pero en este caso en forma no estadísticamente significativa. Dado la forma

de corona elíptica a diámetro mayor horizontal de la sección durante el test, E resulta proporcional al cociente entre el peso P y la deformación (flecha, f) instantáneos (N/mm) e inverso al valor B^3H-b^3h (en el que B,b son los diámetros verticales y H,h los horizontales), en mm^4. Sin embargo, no se observó correlación significativa de E vs P/f ni de E vs B^3H-b^3h para cada hueso, considerando todos los grupos en conjunto. En cambio, P/f y B^3H-b^3h correlacionaron ajustadamente entre sí ($r = 0.96$, $b = 0.59\ mm^4/N/mm$, $p < 0.001$), correspondiendo los pares de valores más altos a los animales TPTX y a los de mayor tamaño. También se observó que la EAel correlacionó significativamente con B^3H-b^3h ($r = 0.83$, $p < 0.001$) y con la relación pared/luz ($r = 0.81$, $p < 0.001$) para todos los huesos en conjunto, resultando los pares de valores ordenados en sentido creciente siguiendo aproximadamente la secuencia: ↓CaD, controles, carbonato, gluconato, ↑CaD, TPTX; es decir, de mayor a menor tasa funcional paratiroidea inducida. La EAt no correlacionó con E ni con B^3H-b^3h. Se interpreta que el crecimiento y la remodelación óseos están dirigidos principalmente a compensar las exigencias referidas a su comportamiento elástico, en base a modificaciones de la forma y del área de su sección eficaz, antes que a cambios cualitativos relativos al módulo de elasticidad; y que el papel fundamental que evidentemente desempeña la PTH en la regulación de este complejo mecansimo se ejercería precisamente sobre la relación entre la forma de la sección y la capacidad de absorción de energía durante el período elástico. Es interesante la potencial aplicación del procedimiento utilizado en el bioensayo de substancias activas sobre el tejido óseo.

118

Efectos hemodinámicos de la amiodarona en perros anestesiados

Susana María Mosca, R. J. Gelpi, H. E. Cingolani

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Mientras que los efectos antiarrítmicos de la amiodarona han sido extensamente estudiados, la literatura con respecto a sus efectos hemodinámicos es contradictoria. Con el objeto de ampliar dichos estudios realizamos 2 grupos de experimentos en perros anestesiados, con tórax abierto y un *strain gauge* suturado en ventrículo izquierdo a los efectos de medir la tensión isométrica desarrollada por un segmento y caracterizar así el inotropismo. Se inyectó a los animales una única dosis de amiodarona intravenosamente que fue de 3.64 ± 0.90 mg/kg de peso. Esta dosis fue estimada previamente como capaz de disminuir la tensión desarrollada (TD) en aproximadamente 30 %. Un grupo de 7 animales fue mantenido a frecuencia espontánea, mientras que el otro grupo fue cardiovertido a una frecuencia cardíaca (FC) de 179 ± 8 lat/min. Las variables medidas fueron la TD, las velocidades máximas de contracción y relajación ($+\dot{T}$ y $-\dot{T}$, respectivamente), la velocidad máxima de desarrollo de la presión ventricular izquierda ($+\dot{P}$), la velocidad máxima de descenso de la presión ventricular izquierda ($-\dot{P}$), la presión arterial (PA) y la FC en el primer grupo. Se calculó el cociente entre el máximo $+\dot{T}$ y el máximo $-\dot{T}$ ($+\dot{T}/-\dot{T}$) y también entre el máximo $+\dot{P}$ y el máximo $-\dot{P}$ ($+\dot{P}/-\dot{P}$). El solvente en el que se disolvió la droga no provocó ninguna modificación en las variables mencionadas. La TD disminuyó un 26 ± 3 % con respecto al control en el primer grupo y un 53 ± 7 % en el segundo grupo. La FC disminuyó desde 165 ± 7 a 113 ± 6 lat/min ($p < 0.01$) a los 15 minutos de inyectar la amiodarona. La PA media disminuyó en 57 ± 5 mmHg ($p < 0.05$) en el primer grupo y en 46 ± 6 mmHg ($p < 0.05$) en el segundo grupo. La relación $+\dot{T}/-\dot{T}$ incrementó en 0.25 ± 0.05 ($p < 0.05$) en el primer grupo y en 0.27 ± 0.08 ($p < 0.05$) en el segundo grupo desde valores controles de 1.17 ± 0.05 y 1.28 ± 0.08, respectivamente. El cociente $+\dot{P}/-\dot{P}$ incrementó en 0.09 ± 0.07 (NS) en el primer grupo y en 0.40 ± 0.07 (p

$<$ 0.05) en el segundo grupo desde valores controles de 1.41 $\pm$ 0.10 y 1.16 $\pm$ 0.07, respectivamente. Podemos concluir: 1) que la amiodarona tiene efectos ino y cronotrópicos negativos, 2) que el efecto inotrópico negativo es por acción directa de la droga sobre el músculo cardíaco y 3) que su acción recae fundamentalmente sobre la velocidad máxima de relajación del miocardio, demostrada por el incremento de la relación $+\dot{T}/-\dot{T}$.

119

Acción de la insulina y del glucagón sobre la producción de glomérulopresina por el hígado aislado de rata

EDITH ARANY, ROSA BONETTO, JULIA URANGA, E. DEL CASTILLO

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Se ha comprobado en perros normales y diabéticos que la insulina disminuye la producción de glomérulopresina por el hígado y que el glucagón la estimula. En estos experimentos se estudió el efecto de distintas dosis de insulina y de glucagón sobre la producción de glomérulopresina por el hígado aislado de rata. Para perfundir los hígados se canuló la vena porta y se prefundió con Krebs-Ringer bicarbonato oxigenado, a pH 7.4, a 38° C y un flujo de 5 ml/min, se colocó un clamp en la arteria hepática y otro en la vena cava, se canuló la vena suprahepática para recoger, durante 20 minutos, la muestra del perfusado, se ultrafiltró a través de membranas Diaflo UM-05 y se ensayó su actividad sobre la tensión tónica contráctil (TTC) del fundus de estómago de rata. Se observó que la adición de insulina 1.5 x 10^{-8}, 1.5 x 10^{-7} y 1.5 x 10^{-6} U/min/kg produce una inhibición de la gomérulopresina proporcional a la dosis de insulina. La dosis de 1.5 x 10^{-6} U/min/kg produce una inhibición casi completa (26 mg $\pm$ 5.7). El glucagón produce un incremento en la producción de glomérulopresina siendo el valor de los controles 134 mg $\pm$ 26.6 pg/ml de glucagón producen una cantidad de glomérulopresina que tiene una actividad de 263 mg $\pm$ 31.6 ($p < 0.005$) sobre la TTC; 60 pg/ml producen una TTC de 309 mg $\pm$ 52.8 ($p < 0.005$) y 600 pg/ml producen 364 mg $\pm$ 56.9 ($p < 0.001$), pero no hay diferencia significativa entre estas dosis. Cuando a la perfusión con 600 pg/ml de glucagón se añaden 1.5 x 10^{-5} U/min/kg de insulina se nota una fuerte potenciación del efecto del glucagón. Estos resultados sugieren que la producción de glomérulopresina es influida por el glucagón y la insulina y que hay una relación específica entre las concentraciones de estas hormonas que es muy efectiva en la producción de glomérulopresina.

120

Acción de la teofilina y del dibutiril AMPc sobre la producción de glomérulopresina por hígado aislado de rata

EDITH ARANY, ROSA BONETTO, JULIA URANGA, E. DEL CASTILLO

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

La glomérulopresina es una hormona producida por el hígado de sapo, conejo y perro. En este trabajo se estudió si el hígado aislado de rata produce glomérulopresina y si esta producción está mediada por el AMP cíclico. Para ello se perfundió hígado aislado de ratas Wistar, hembras, de 200-300 gm anestesiadas con 33 mg/kg de pentobarbital, se canuló la vena porta *in situ* y se perfundió con Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) oxigenado y a pH 7.4 a 37° C y un flujo de 5 ml/min; se colocó un clamp en la arteria hepática y la vena cava, se canuló la vena suprahepática para recolectar durante 20 minutos el perfusado. La muestra fue centrifugada y el sobrenadante ultrafiltrado a través de membranas UM-05 Diaflo. El ultrafiltrado fue conservado a $-10°$ C hasta el momento de su uso. Se midió su actividad para su efecto sobre la tensión tónica contráctil (TTC) del fundus de estómago de rata. En cada ensayo una alícuota del ultrafiltrado fue incubado con β-glucuronidasa para confirmar si el efecto observado en el fundus de estómago se debía a la glomérulopresina. Se observó

que los hígados perfundidos con KRB producen glomérulopresina que eleva la TTC en 110 mg ± 17.9, la adición de 0.002 mM de teofilina incrementa ligeramente la producción de glomérulopresina (178 mg ± 34), 0.02 mM de teofilina produce un incremento mayor (315 mg ± 24.7) significativamente superior a la dosis de 0.002 ($p < 0.002$). Dosis mayores de teofilina 0.2 mM producen una inhibición del estómago que inhiben la respuesta a la glomérulopresina. El dibutiril AMPc también aumenta significativamente la producción de glomérulopresina, 0.005 mM producen una actividad de 264 mg ± 42.8 ($p < 0.005$) y este incremento es mayor con 0.5 mM, 404 mg ± 56.2 ($p < 0.005$). Estos resultados sugieren que la producción de glomérulopresina por el hígado es mediada por el AMPc.

121

Efecto del pH sobre los niveles de AMPc en respuesta a las catecolaminas

María Cristina Camilión de Hurtado
María Isabel Argel, H. E. Cingolani

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio permitieron establecer que en la aurícula aislada de rata la disminución del pH extracelular produce 2 efectos simultáneos: *a*) una disminución de la frecuencia espontánea, y *b*) una menor sensibilidad al estímulo cronotrópico positivo de las catecolaminas. La subsensibilidad a las catecolaminas podría estar determinada por una alteración a nivel del β-receptor, por modificaciones en las características de la membrana y/o por alteraciones en los fenómenos intracelulares que determinan la respuesta final cronotrópica. Es generalmente aceptado que los efectos cronotrópicos de los agonistas β son mediados a través de incrementos de los niveles intracelulares de AMPc. El presente trabajo se llevó a cabo con la finalidad de establecer si la subsensibilidad al efecto cronotrópico de las catecolaminas está o no relacionada con una modificación en los incrementos de AMPc inducidos por la estimulación β adrenérgica. En aurículas aisladas de rata latiendo espontáneamente, se determinaron los aumentos de frecuencia y del contenido de AMPc producidos por la incubación durante 3 minutos con concentraciones crecientes (10^{-10} a 10^{-6} mol/l) de ± isoproterenol (ISO) a tres valores de pH extracelular: 7.61 ± 0.01, 7.44 ± 0.01 y 7.01 ± 0.01. Los efectos de la alteración del pH sobre el automatismo fueron similares a los descriptos previamente observándose una disminución de la frecuencia espontánea y de la sensibilidad al efecto cronotrópico del ISO al disminuir el pH. El contenido basal de AMPc (expresado en pmol/mg de tejido húmedo) no difirió significativamente entre las aurículas incubadas a diferentes pH: 0.491 ± 0.022 pmol/mg (pH: 7.61) ($n = 15$); 0.435 ± 0.022 pmol/mg (pH: 7.44) ($n = 16$) y 0.518 ± 0.047 pmol/mg (pH: 7.01) ($n = 13$). La incubación con ISO produjo un aumento de concentración dependiente de los niveles de AMPc a los 3 pHs estudiados. Sin embargo la habilidad del ISO para inducir aumentos de AMPc se modificó al variar el pH del medio, determinando que la curva dosis-respuesta para AMPc se desplazase hacia la derecha al disminuir el pH. Así a pH 7.44 necesitaron concentraciones 10 veces mayores de ISO para producir incrementos de AMPc similares a los obtenidos a pH 7.61, sin cambios en el efecto máximo. A pH 7.01 el desplazamiento de la curva hacia la derecha fue aun mayor, observándose además una disminución del máximo aumento en el nivel de AMPc que fue de 0.672 ± 0.047 pmol/mg, valor significativamente menor que los alcanzados a pH 7.61 (0.971 ± 0.070 pmol/mg) y a pH 7.44 (0.928 ± 0.103 pmol/mg) ($p < 0.05$). Estos resultados indican que la disminución del pH extracelular disminuye la sensibilidad del tejido auricular a las catecolaminas involucrando una alteración en los fenómenos bioquímicos iniciales inducidos por la estimulación del receptor β.

122

Acción de diversas drogas vasodilatadoras sobre la musculatura lisa coronaria

G. J. Rinaldi, H. E. Cingolani

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

La acción vasodilatadora de los nitratos sobre los vasos de conductancia del corazón ha sido repetidamente demostrada. Recientemente, otros grupos de drogas con acción semejante han sido utilizados, entre ellos los antagonistas del calcio y las sidnoniminas sustituidas. La molsidomina, entre estas últimas, actuaría en forma indirecta, liberando a nivel hepático un metabolito vasoactivo, el SIN-1, de mecanismo de acción propuesto similar al de los nitratos. Dada la importancia que los vasos de conductancia adquieren en ciertos procesos patológicos (espasmo coronario, isquemia miocárdica), se decidió estudiar la acción directa de las drogas mencionadas sobre los mismos. Se utilizaron en las experiencias corazones caninos recién extraídos, extirpándose las ramas descendente anterior y/o circunfleja de la coronaria izquierda. Los vasos se cortaron en forma helicoidal, obteniéndose segmentos que fueron inmediatamente colocados en una cámara llena de solución de Krebs-Henseleit, mantenida a 37° C y burbujeada con una mezcla de 5 % de CO_2 en O_2. El extremo inferior del segmento se fijó al fondo de la cámara, y el superior a un transductor de fuerza desplazable en sentido vertical. Se provocó contractura elevando la concentración de KCl a 35 mM, y al estabilizarse la misma se agregó a la cámara la droga en estudio, en concentración final de 10^{-6} M. Se registró el efecto a lo largo de 7 h. Las drogas empleadas fueron. nitroglicerina (NTG, N = 14), nifedipina (NIFE, N = 13), molsidomina (MOLS, N = 11) y SIN-1 (N = 13). Se utilizaron como control segmentos contracturados y mantenidos en ese estado durante el mismo tiempo (N = 33). Se midió para cada droga la máxima relajación porcentual obtenida (intensidad), el tiempo empleado en llegar al 50 % de la máxima relajación (velocidad); y el tiempo empleado en retornar a ese valor luego de haber pasado por la relajación máxima (duración), expresando los resultados como media y su error standard. La intensidad de relajación fue de 16 ± 4 % para MOLS ($p < .05$); 60 ± 5 % para NTG ($p < .01$), 86 ± 3 % para NIFE ($p < .01$) y 86 ± 2 % para SIN-1 ($p < .01$). La velocidad de relajación fue de 54 ± 7 seg para NTG, 65 ± 9 seg para NIFE y 249 ± 27 seg para el SIN-1. La duración de la relajación fue de 167 ± 14 min para el SIN-1, 310 ± 21 min para la NTG y mayor de 7 h para la NIFE. Se concluye que a dosis equimolares la intensidad de relajación es máxima y de igual magnitud en NIFE y SIN-1, intermedia en NTG y mínima en MOLS; la velocidad de relajación es máxima y de igual magnitud en NTG y NIFE, intermedia en SIN-1 y mínima en MOLS; y la duración de la relajación es decreciente en el siguiente orden: NIFE, NTG, SIN – 1 y MOLS.

123

Distribución de flujo miocárdico: fibrilación ventricular vs paro cardíaco

R. J. Gelpi, Susana María Mosca, G. J. Rinaldi, H. E. Cingolani

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Durante mucho tiempo se ha utilizado indistintamente la fibrilación ventricular y el paro cardíaco en diferentes situaciones experimentales en las cuales se hiciera necesario evaluar parámetros en condiciones de asistolia. El presente trabajo fue diseñado con el objeto de conocer la distribución de flujo miocárdico en estas dos situaciones experimentales de asistolia. Se realizaron 14 experiencias en preparados de corazones perfundidos de perro (Heymans y Kochman). La distribución de flujo miocárdico (endo y epicardio) se determinó en zonas de la base, medio y punta de la pared ventricular izquierda por medio de microesferas radiactivas de 15 μm de diámetro marcado con ^{103}Ru y ^{141}Ce. Los flujos fueron determinados por gramo de tejido y luego se estableció la relación entre endocardio

(endo) y epicardio (epi) de los dos grupos experimentales: Grupo I°: corazones perfundidos a flujo coronario constante en los cuales se indujo fibrilación ventricular por estimulación eléctrica. Los datos de flujo obtenido fueron los siguientes: base: endo 0.44 ± 0.02 ml/min . g, epi 0.35 ± 0.03 ml/min . g; medio: endo 0.42 ± 0.03 ml/min . g, epi 0.32 ± 0.02 ml/min . g; y punta: endo 0.43 ± 0.01 ml/ming . g, epi 0.34 ± 0.02 ml/min . g. Cuando estos flujos se expresaron como relación endocardio/epicardio los datos obtenidos fueron: 143 ± 0.19, 1.41 ± 0.06, 1.39 ± 0.13 para base, medio y punta, respectivamente. Grupo II: corazones perfundidos a flujo coronario constante con cese de la actividad mecánica y eléctrica inducida por ClK. Los datos de flujo obtenido fueron los siguientes: base: endo 0.60 ± 0.04 ml/min . g, epi 0.27 ± 0.01 ml/ming . g; medio: endo 0.71 ± 0.02 ml/min . g, epi 0.32 ± 0.01 ml/min . g; y punta: endo 0.64 ± 0.02 ml/min . g, epi 0.31 ± 0.02 ml/min . g. Cuando estos grupos se expresaron como cocientes endocardio/epicardio los datos obtenidos fueron de 2.19 ± 0.08, 2.31 ± 0.16, 2.06 ± 0.10 para base, medio y punta, respectivamente. Concluimos que, si bien las dos situaciones experimentales llevan al corazón a un estado de asistolia la distribución de flujo miocárdico es diferente, siendo el aporte de sangre al endocardio, proporcionalmente mayor en el paro cardíaco que en la fibrilación ventricular.

124

Naturaleza del antagonismo entre el calcio y la nifedipina, prenilamina y verapamil sobre la contractilidad miocárdica

ALICIA MATTIAZZI, A. GARAY

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Es conocido que la depresión de la contractilidad miocárdica que producen las drogas denominadas "antagonistas del calcio" puede ser revetida por el agregado del calcio. Se desconoce, sin embargo, la naturaleza de este antagonismo. A fin de dilucidar el tipo de antagonismo que estas drogas tienen con el calcio sobre la contractilidad se realizaron experimentos en músculos papilares de ventrículo derecho de gato, contrayéndose a frecuencia y temperatura constantes. Luego de un período de estabilización, se realizaron curvas dosis respuesta al calcio en ausencia y presencia de nifedipina: 5×10^{-7} M, prenilamina: 1×10^{-6} M y verapamil 5×10^{-7} M. La contractilidad se caracterizó por la medida de la tensión desarrollada (TD) y de la máxima velocidad de desarrollo de la tensión (+dT/dt max), midiéndose además el tiempo hasta el pico de la tensión desarrollada (TTP). Tanto en ausencia como en presencia de la droga, la contractilidad aumentó con el agregado de calcio hasta llegar a un *plateau*. Este máximo no fue significativamente diferente en ausencia y presencia de las drogas. Para +dT/dt max estos valores fueron (en g/mm²/seg): control (C): 60.3 ± 4, nifedipina: 56.8 ± 4.4; C: 31.2 ± 8.4, prenilamina: 34.2 ± 9.1; C: 63.0 ± 9.7, verapamil: 62.3 ± 9.1. En las condiciones controles (sin droga), el agregado de calcio produjo la ya conocida disminución del TTP (en mseg) desde 347 ± 14 (calcio 1.34 mM) a 302 ± 8 (calcio 15 mM) ($p < 0.05$). A bajas concentraciones de calcio (1.34 mM) las tres drogas disminuyeron significativamente el TTP: C: 345 ± 16 mseg, nifedipina: 253 ± 6 mseg; C: 324 ± 23 mseg, prenilamina: 267 ± 16 m seg; C: 361 ± 29 mseg, verapamil: 309 ± 20 mseg. El agregado de calcio revirtió totalmente este efecto, observándose el paradójico hecho de que en presencia de estos antagonistas el aumento de calcio extracelular aumenta en lugar de disminuir el TTP. Cuando los datos fueron tratados con el método de las dobles recíprocas, los mismos se ajustaron a una recta en todos los casos, aunque el coeficiente de correlación con la recta fue siempre menor en presencia de la droga Los valores obtenidos para la inversa del efecto máximo (dT/dt max): 1/E max expresado en 1/g/mm²/seg y la inversa de la concentración del calcio necesaria para obtener el 50 % del máximo +dT/dt max, $-1/(Ca^{2+})_{50}$ expresadas en 1/mM fueron los siguientes: 1/E max: 0.016

$\pm$ 0.003 y 0.0013 $\pm$ 0.012 (NS) y $-1/(Ca^{2+})_{50}$: -0.36 ± 0.008 y -0.11 ± 0.033 ($p < 0.05$) para control y nifedipina, respectivamente. 1/E max: 0.044 $\pm$ 0.016 y 0.033 $\pm$ 0.006 (NS) y $-1 (Ca^{2+})_{50}$: 0.48 $\pm$ 0.11 y -0.24 ± 0.09 ($p < 0.05$) para control y prenilamina, respectivamente. 1/E max: 0.03 $\pm$ 0.012 y 0.03 $\pm$ 0.015 (NS) y $(Ca^{2+})_{50}$: -31 ± 0.05 y -0.13 ± 0.04 ($p < 0.05$) para control y verapamil, respectivamente. Los resultados sugieren que el antagonismo que estas drogas poseen con el calcio sobre la contractilidad miocárdica es de tipo competitivo.

125

Hiperaldosteronismo y aptialismo en la insuficiencia renal aguda

J. C. Santos, C. Ruhlmann, D. Bes, Beatriz Leber, V. E. Nahmod, Elvira Arrizurieta, S. Finkielman

Instituto de Investigaciones Médicas y Departamento de Análisis Clínicos del Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

En la insuficiencia renal aguda (IRA) se han observado con regularidad ascensos de la actividad renínica plasmática (ARP) y la concentración de angiotensina II. Junto con los valores altos de la enzima y del polipéptido, los pacientes suelen presentar hiperkalemia y se encuentran en una particular situación de stress. Estos son estímulos que, de operar normalmente, deberían provocar en los afectados una hipersecreción de aldosterona. Sin embargo esta posibilidad ha sido escasamente explorada y un único estudio sobre la concentración de aldosterona plasmática en la IRA muestra que el hiperaldosteronismo aparece en forma excepcional, 2 casos sobre 18 (Paton y col, *Clin Nephrol* 3: 18, 1975). El presente trabajo se llevó a cabo con el objeto de establecer la existencia, o no, de hiperaldosteronismo secundario en la IRA en relación a la hiperreninemia. Se estudiaron 13 pacientes de 23 a 68 años, 9 mujeres y 4 varones que presentaron IRA por aborto séptico (5 casos), postobstructiva (2), postquirúrgica (1), por leptospirosis (1), por hemoglobinuria paroxística (1), postpielografía (1), por glomérulonefritis rápidamente evolutiva (1) y con etiología no aclarada en 1 caso. En ellos se determinó la concentración de aldosterona plasmática y de ARP por radioinmunoensayo en muestras de sangre obtenidas en decúbico supino por la mañana. Asimismo se estimó la urea en sangre, los electrolitos en plasma y saliva y el volumen de flujo de saliva. De 29 determinaciones de aldosterona efectuadas en distintos momentos de la evolución de la enfermedad se demostró que 12 eran elevadas (rango normal: 12 a 125 pg/ml); los valores elevados, que oscilaron entre 140 y 800 pg/ml, correspondieron a 8 de 13 pacientes (62 %). Nuestros datos parecerían indicar que durante los primeros días de la enfermedad los niveles de aldosterona son normales. La ARP resultó elevada en todos los casos medidos, salvo en uno, en el que coincidió con una concentración de aldosterona normal. La relación Na/K en saliva fue con frecuencia anormalmente baja (menor de 0.5) pero ello no guardó relación con los niveles de aldosterona sino que pareció resultar de una notable disminución del flujo salival (dado que la concentración de sodio es flujo dependiente). El flujo de saliva en 17 pacientes con IRA, medido en los primeros cinco días de la enfermedad, fue 0.28 $\pm$ 0.5 ml/min. Este valor es significativamente menor ($p < 0.02$) que el de 10 controles normales: 0.73 $\pm$ 0.4 ml/min. El flujo de saliva de los pacientes con IRA tendió a normalizarse con la evolución de la enfermedad. Se estudió además una paciente con sepsis grave por aborto, sin lesión renal, cuya concentración plasmática de aldosterona, ARP, flujo salival y relación Na/K en saliva fueron normales. En conclusión, en nuestros pacientes con IRA, el hiperaldosteronismo es una situación prevalente y la hiperreninemia parece ser una condición suficiente y necesaria para su desarrollo. No es clara la razón del aptialismo que es un signo generalizado pero no reconocido.

126

Control de la evolución del riñón transplantado por medio de la función biopsia aspirativa con aguja fina

O. A. López Blanco, N. H. Cavalli, L. Verruno, J. C. Sánchez Avalos, M. A. Nadal, Aurora Boschi, D. Gotlieb

Equipo de Transplantes, Sanatorio Güemes, Buenos Aires

Desde mayo de 1979 se efectuaron 100 punciones biopsia aspirativas con aguja fina (PBAAF) en pacientes transplantados (60 % con donantes vivos y 40 % cadavéricos), evaluando la utilidad clínica y las posibles complicaciones del estudio de la citología de riñones con y sin rechazo. Método (modificación del descripto por Pasternack, *Lancet* 2: 82, 1968): con un trócar de 0.8 × 80 mm se punzó un polo del riñón. Se reemplazó el mandril por una jeringa de 20 ml, heparinizada previamente y se realizaron una o dos vigorosas aspiraciones. El material obtenido fue diluido con 0.5 ml de un medio de cultivo para células (RPMI-1640), aspirado a través de la misma aguja y se lo sometió a citocentrifugación. Luego era coloreado con Giemsa y estudiado mediante microscopía de luz. Resultados: 1) Pre-transplante y riñones sin rechazo (12 observaciones): se identificaron células parenquimatosas renales de diferentes tipos, escasos polimorfonucleares y algunos hematíes. 2) Rechazo agudo (64 observaciones): Idem (1) más intenso infiltrado mononuclear (macrófagos, linfocitos y linfoblastos —algunos en mitosis—) y, en ocasiones, eosinófilos y plasmocitos. Se observó la desaparición del infiltrado luego del tratamiento exitoso del rechazo (16 observaciones). El método mostró una correlación del 95 % con la clínica (y con la histología, en las ocasiones en que se efectuó una biopsia renal percutánea junto con la PBAAF —8 casos—). En un 17 % de los casos no se obtuvo material. Complicaciones: no se detectaron. Conclusiones: La PBAAF constituye una valiosa ayuda para el diagnóstico diferencial de las crisis agudas de rechazo del riñón transplantado, ya que: *a)* es independiente del grado de función del injerto; *b)* es un método de monitoreo inmunológico que se basa en la respuesta del huésped; *c)* es de rápida y sencilla realización; *d)* puede ser repetido con la frecuencia que se considere conveniente para un seguimiento adecuado, porque es un procedimiento muy poco agresivo, no habiéndose registrado complicaciones.

127

Reversión de la acción natriurética y vasodilatadora renal de la dopamina por indometacina

G. Altenberg, M. Barrera, J. Caubet, F. Rainoldi, D. Prigollini, D. Gotlieb, N. L. Yeyati

Hospital de Clínicas José de San Martín, Servicio de Nefrología y Segunda Cátedra de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La acción vasodilatadora renal y natriurética de la acetilcolina y la bradiquinina puede ser abolida por la administración de inhibidores de la síntesis de prostaglandinas. La dopamina provoca, asimismo, vasodilatación renal y natriuresis. Nuestro objetivo fue investigar si dichos efectos pueden ser revertidos por un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas. Con tal objeto, estudiamos en 4 sujetos con función renal normal los efectos de la infusión de clorhidrato de dopamina (6 μg/kg/min) y manteniendo dicha infusión administramos indometacina (2 mg/kg). La dopamina aumentó la diuresis de 1.7 $\pm$ 0.15 a 7.06 $\pm$ 1.3 ml/min la excreción urinaria de Na de 65 $\pm$ 7 a 425 $\pm$ 57 μEq/min el clearance de Hippuran ^{131}I de 372 $\pm$ 20 a 460 $\pm$ 31 ml/min; el clearance de creatinina no se modificó y la osmolaridad urinaria descendió de 355 $\pm$ 10 a 174 $\pm$ 2 mOsm/kg de agua. La IMT administrada mientras se mantenía la infusión de dopamina redujo la diuresis a 2.03 $\pm$ 0.053 ml/min, $p < .01$, la natriuresis a 235 $\pm$ 69 μEq/min, $p <$ .0.1, el clearance de Hippuran a 281 $\pm$ 86 ml/min, no alterando el de la creatinina. La osmolaridad urinaria se elevó a 388 $\pm$ 41 mOsm/kg de agua. Concluimos: 1) La dopamina aumenta la diuresis, la excreción urinaria de Na y el flujo plasmático renal sin alterar el filtrado glomerular. 2) El descenso de la osmolaridad urinaria llegando en algunos casos a generar clearance de agua libre puede ser atribuido a un aumento del flujo sanguíneo medular y/o a una acción antagónica con la hormona antidiurética. 3) La reversión parcial del efecto vasodilatador y natriurético de la dopamina por la indometacina sugieren que los mismos podrían ser mediados por el sistema de las prostaglandinas renales.

128

Potenciación del efecto beta-adrenérgico del suero de pacientes chagásicos EVI-positivos por linfocitos humanos. Acción sobre aurícula aislada de rata

SUSANA FINK, LEONOR STERIN-BORDA, C. DIEZ, P. M. COSSIO, MARÍA M. DE E. DE BRACCO

Instituto de Investigaciones Médicas, CEFAPRIN y CEMIC, Buenos Aires

En trabajos previos se comprobó que el suero fresco de pacientes chagásicos crónicos con serología EVI (+) se comportaba como un agonista beta parcial, capaz de estimular la frecuencia auricular y atenuar los efectos de la nor-epinefrina exógena. Por el contrario, el suero de pacientes chagásicos con serología EVL (−) o el suero humano normal (SHN) carecían de efecto sobre la preparación de aurícula de rata aislada. Como el suero EVI (+) inactivado a 56°30 min (EXI (+) 56°) o la IgG EVI (+) purificada, empleada en el ensayo en igual concentración (0.1 mg/ml) carecían de efecto, consideramos que el EVI (+) podría actual sobre la aurícula disparando la acción de un sistema efector humoral (complemento) o celular (células con receptor para Fc). En este trabajo estudiamos la influencia de linfocitos humanos normales sobre aurículas de rata aisladas latiendo en 10 ml de solución de Krebs-Ringegr-bicarbonato, a la que se agregaron los reactivos inmunológicos: EVI (+) 56°, n = 6; EVI (−) 56°, n = 5; SHN 56, n = 4 en concentraciones desde 1.2×10^{-2} a 1.2×10^{-5}; IgG EVI (+) purificada cromatográficamente de un pool de pacientes EVI (+) y/o linfocitos humanos (4×10^{2} - 4×10^{5}/ml). Estos se purificaron por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque (F-H) obteniendo así células mononucleares (LM). Los LM se desplecionaron de monocitos por fagocitosis de limaduras de hierro (37°30 min) seguida de centrifugación sobre F-H. Los linfocitos obtenidos (L) se separaron en: células formadoras de rosetas-E (LT) o no formadoras (L no-T) por centrifugación diferencial sobre F-H. La fracción sedimentada (LT) y la de la interfase (L no-T) se sometieron a shock hipotónico para eliminar los E. Los LM, L, LT y L no-T se incubaron a 37° en atmósfera de 5 % de CO_2 y humedad controlada durante 15-18 h. Se midieron los cambios porcentuales en la tensión isométrica desarrollada (IDT) y en la frecuencia (F) de los latido sauriculares con respecto a la IDT y F previa al agregado de los reactivos inmunológicos. Se observó que los LM, L o los L no-T agregados a la preparación de aurícula aislada en presencia de IgG EVI (+) o de EVI (+) 56° provocaban un incremento de la IDT y de F que alcanzó valores máximos luego de 50 min de reacción, para una concentración de 4×10^{5} L/ml y EVI (+) 56° 1.2×10^{-2} (IDT %, $\bar{x} \pm ES = +102 \pm 7$; F %, $\bar{x} \pm ES = +28 \pm 2$). Este efecto era dependiente tanto de la concentración de linfocitos como de la de anticuerpos. Las células efectoras fueron los linfocitos, ya que las preparaciones de células efectoras deplecionadas de monocitos fueron igualmente activas. El receptor Fc linfocitario era esencial para la reacción, pues su bloqueo por preincubación de los L durante 1 h con IgG agregada por el calor (60° 10 min) anuló el efecto. La fracción linfocitaria activa se encontraba dentro de las células no formadoras de rosetas-E (L no-T). El agregado de inhibidores de prostaglandinas (indometacina 10^{-6} M) o antihistamínicos (Pyrilamine 10^{-6} M) no interfirió con el efecto inotrópico y cronotrópico positivo de L y EVI (+) sobre la aurícula. En cambio un antagonista beta-adrenérgico (propranolol 10^{-7} M) agregado antes o después de los reactivos inmunológicos anuló su efecto. En conclusión, los linfocitos humanos normales actúan en conjunto con anticuerpos presentes en el suero de pacientes chagásicos EVI (+) provocando un efecto similar al de un agonista beta-adrenérgico sobre la aurícula aislada de rata. Resulta difícil especular sobre el significado clínico de este hallazgo. Sin embargo, como el infiltrado linfo-monocitario del miocardio es típico en los pacientes con cardiopatía chagásica crónica y estos pacientes tienen generalmente serología EVI (+), sería interesante saber si los linfocitos normales o de pacientes chagásicos podrían actuar en un sistema homólogo provocando efectos similares.

129

Efecto de fracciones de plasma urémico sobre la respuesta linfoproliferativa in vitro

MARÍA DEL CARMEN SAMANIEGO, ALCIRA NESSE, ELVIRA ARRIZURIETA DE MUCHNIK

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina y Cátedra de Análisis Biológicos, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Diversos trabajos han señalado la existencia de una depresión de la inmunidad celular en la uremia crónica (IRC), desconociéndose aún la naturaleza de los factores responsables. En el presente trabajo se estudió el efecto que ejercen fracciones de plasma urémico sobre el crecimiento in vitro de linfocitos de personas sanas. Se obtuvieron fracciones de sustancias de peso molecular menores de 2500 d a partir de ultrafiltrados de plasma de 10 pacientes urémicos no dializados y de 6 sujetos normales mediante cromatografía de exclusión. El eluido de las diferentes fracciones se agregó al medio de cultivo en el cual proliferaron los linfocitos respondiendo a un estímulo alogeneico y a un estímulo inespecífico con PHA. Se utilizó la microtécnica de O'Leary y col. empleando como medio de cultivo RPMI - 1640 + 20 % de suero humano AB. La proliferación se midió por la incorporación de ^{3}H-timidina a las células y los resultados se expresaron como variación porcentual respecto de los ensayos controles que no incluyeron fracciones. Las fracciones obtenidas de pacientes con IRC terminal, produjeron una marcada disminución de la respuesta inespecífica a la PHA (índice de estimulación IE de 40.8 $\pm$ 8.9 y de la proliferación en el cultivo mixto de linfocitos (MLC), IE de 29.5 $\pm$ 1.9). Las fracciones provenientes de sujetos normales produjeron sólo una leve depresión, IE 85.3 $\pm$ 3.7. El ensayo de subfracciones separadas según sus pesos moleculares mostró que el efecto inhibitorio era producido por dos subfracciones con peso molecular $<$ de 500 d (IE 31.8 $\pm$ 7.2 y 18.9 $\pm$ 1.4), mientras que las subfracciones de mayor peso molecular (entre 500 y 2500 d) no indujeron modificaciones en la respuesta del MLC (IE 114.8 $\pm$ 6.3) ($\bar{x}$ $\pm$ ES). Los resultados sugieren que el efecto inhibitorio producido por el suero urémico, descripto previamente por otros autores, podría ser atribuido a sustancias plasmáticas de bajo peso molecular. Es probable que en esas fracciones urémicas se encuentre un factor inhibitorio, pudiendo descartarse la carencia de un factor estimulador debido a que todos los cultivos se realizaron en presencia de cantidades suficientes de suero AB. El inhibidor actuaría por un mecanismo diferente del de la citotoxicidad directa, ya que se conservó la viabilidad celular. Los resultados obtenidos sugieren que las sustancias de bajo peso molecular, retenidas por los pacientes urémicos, podrían contribuir a la inmunosupresión que sufren esos pacientes.

130

Acción de la metoclopramida sobre la liberación de catecolaminas de feocromocitomas humanos

E. ADLER-GRASCHINSKY, M. C. RUBIO, M. BARONTINI DE MOYANO

Instituto de Investigaciones Farmacológicas (CONICET) y Hospital de Niños, Buenos Aires

Se ha referido que la administración intravenosa de metoclopramida (MC) provoca una crisis hipertensiva y un aumento de catecolaminas (CA) plasmáticas en pacientes con feocromocitoma, efectos que no se manifiestan ni en hipertensos esenciales o renales ni luego de la extirpación del tumor (Agabiti-Rosei y col., *Lancet*, 600, 1977). El objetivo de la presente comunicación ha sido estudiar si la MC provoca in vitro la liberación de CA de feocromocitomas extirpados de pacientes y si tiene un efecto similar sobre la glándula adrenal de la rata, seleccionada como modelo de control experimental. Alrededor de 50 a 100 mg de tejido fueron sumergidos a 37° C en 5 ml de solución de Krebs gaseada con carbógeno. Se tomaron dos muestras consecutivas de 150 segundos de duración (L_1 y L_2) para evaluar fluorimétricamente la cantidad de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) liberadas por el tejido en la solución de Krebs. Los cocientes de liberación (L_2/L_1) obtenidos en salina fueron

comparados con los observados en presencia de drogas agregadas durante L_2. En tres tumores noradrenérgicos que contenían 98.5 ± 0.5 % de NA sobre un total de CA de 6.83 ± 2.44 mg/g, los cocientes control L_2/L_1 fueron 0.90 ± 0.10 para NA y 0.92 ± 0.01 para A. La exposición a MC 10 μM durante L_2 no modificó la liberación de NA, pero incrementó en un 50 % el eflujo de A ($L_2/L_1 = 1.46 \pm 0.12$, $p < 0.025$). En un tumor mixto (58 % de NA sobre un contenido total de CA de 29.5 mg/g), una concentración mayor de MC, 100 μM, aumentó la liberación tanto de A como de NA. Los cocientes L_2/L_1 en los controles: 1.16 para NA y 1.03 para A, fueron elevados respectivamente a 1.68 y 1.70 en presencia de MC. Un agente liberador tipo reserpínico que se empleó con fines comparativos, el Ro 4-1284 (100 μM), también aumentó en un 50 % la liberación de ambas aminas. En un número de preparaciones de adrenal de rata igual al de los tumores estudiados, ni la MC (10 y 100 μm) ni el Ro 4-1248 (100 μM) aumentaron la liberación de CA. La falta de acción de estas drogas sobre la médula adrenal de la rata no parece estar relacionada con una eventual influencia moderadora de los corticoides adrenales, porque en condiciones de inhibición de su síntesis por administración i.p. de metopirona (200 mg/kg/día durante 3 días) tampoco aumentó la liberación de CA en presencia ya sea de MC o del agente reserpínico. Cabe mencionar que luego del tratamiento con metopirona disminuyó en un 65 % el contenido endógeno de CA en la glándula adrenal (0.34 ± 0.02 mg/g en los controles y 0.12 ± 0.02 mg/g, $p < 0.001$, en el grupo tratado con metopirona). Esta reducción se produjo a expensas de la A tisular que decayó del 77.7 ± 0.2 % al 59.7 ± 1.1 % ($p < 0.001$) y coincidió con una reducción en la actividad de la enzima metilante de la NA, la PNMT (de 62.40 ± 1.71 μmoles.g^{-1}.h^{-1} a 21.77 ± 2.12 μmoles.g^{-1}.h^{-1}, $p < 0.001$). Por otra parte, en una porción de vena safena extraída del paciente con el feocromocitoma de tipo mixto el tenor de CA totales ascendió a 9.75 mg/g, valor por lo menos 1000 veces mayor que los normales referidos para venas de distintas especies. Este dato, junto con los resultados de liberación en los tumores, sugiere que en pacientes con feocromocitoma puede haber alteraciones de los mecanismos farmacológicos de liberación de CA no sólo en el tumor sino también en tejidos periféricos y, en consecuencia, debe administrarse con cautela cualquier fármaco potencialmente liberador de CA.

131

Localización ultraestructural de proteínas específicas epididimarias (PEE) sobre los espermatozoides de la rata

MÓNICA S. CAMEO, FERNANDA GONZÁLEZ ECHEVERRÍA, J. A. BLAQUIER

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

La andrógena dependencia del proceso de maduración de los espermatozoides ha sido claramente demostrada en nuestro laboratorio y también por otros autores en diversas especies de mamíferos. En respuesta al estímulo androgénico el epidídimo produce y secreta glicoproteínas (PEE) que interactúan con los espermatozoides en maduración. Utilizando un método cuantitativo para la determinación de PEE de rata, pudimos establecer anteriormente que la cantidad de estas proteínas unidas a los espermatozoides aumentaba de 189 U/10^6 células en espermatozoides de cabeza del epidídimo a 477 U/10^6 células en espermatozoides recuperados de la cola del órgano. Nuestros experimentos preliminares, utilizando la técnica de inmunofluorescencia, indicaban que el antígeno se localizaba principalmente sobre la región de la cabeza del espermatozoide. En el presente trabajo hemos utilizado la tinción inmunocitoquímica peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) para estudiar, con mayor sensibilidad y usando la microscopía óptica y electrónica de transmisión, la localización de PEE sobre los espermatozoides de la rata. Los datos obtenidos de la observación al microscopio óptico permitieron confirmar resultados anteriores obtenidos por inmunofluorescencia. PEE se localizan exclusivamente sobre la cabeza del esperma-

tozoide maduro, especialmente sobre la región de la membrana plasmática que recubre al acrosoma. Se observó una mayor tinción sobre la cara dorsal del espermatozoide que sobre su cara ventral. Asimismo, se observó la falta de reacción inmunocitoquímica cuando se examinaron espermatozoides inmaduros obtenidos del segmento inicial del epidídimo. Estos resultados fueron confirmados mediante la microscopía electrónica de transmisión, con la que pudimos descartar la presencia de PEE en otras regiones del espermatozoide fuera de la cabeza. Asimismo, se pudo estudiar con más detalle la unión de PEE a regiones limitadas dentro de la membrana que recubre la cabeza del espermatozoide. Por último, se confirmó la diferencia cuantitativa en PEE unida a espermatozoides recuperados de segmentos sucesivos del epidídimo, es decir, en distintos estadíos de su maduración. Presentamos también resultados preliminares de experimentos en los cuales los espermatozoides fueron preincubados en medios capacitantes. Dada la importancia de la región acrosomal y postacrosomal de la membrana en los fenómenos de reconocimiento de gametas y la fertilización, consideramos de interés la observación de los cambios que sufren los antígenos de superficie durante este proceso. Agradecemos a los doctores Mario Bilinsky y Héctor Chemes su colaboración y al Instituto de Neurobiología por el uso del microscopio electrónico.

132

Regulación del volumen celular de la médula externa renal II. Acción de la furosemida

Graciela Bazzoni, Gladis Hernández, Ada Crespo, Sara W. de Jairala

Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

Se sostiene que la furosemida ejerce su acción diurética fundamentalmente en la rama ascendente del asa de Henle inhibiendo el transporte activo de Cl^-. En este trabajo se ha estudiado su influencia sobre la regulación del volumen celular, aspecto aún no investigado. La metodología utilizada es similar a la desarrollada en trabajos presentados anteriormente. Sintéticamente, consiste en incubar a 37° C y en atmósfera de O_2 cortes delgados de médula externa renal de perro en soluciones Ringer de diferentes osmolalidades obtenidas variando la concentración de ClNa: 260 mOsm/kg de H_2O; 534 mOsm/kg de H_2O (considerado isosmótico) y 822 mOsm/kg de H_2O. El modelo experimental se realizó en presencia y ausencia de 1 mM de furosemida adicionada a los medios; la incubación se prolongó durante 60 minutos, al cabo de los cuales se extrajo el tejido y en él se analizaron los contenidos de H_2O, Na^+, K^+ y Cl^-. En forma paralela se determinó el espacio de distribución de inulina que se utilizó como estimación del espacio extracelular para calcular los contenidos celulares de H_2O e iones. Los resultados expresados por kg de tejido seco, en ausencia de furosemida, fueron: medio 260 mosm/kg de H_2O : H_2O_i : 2.35 ± 0.06 kg; Na^+_i: 188.0 ± 6.0 mM; K^+_i: 168.6 ± 6.4 mM; Cl^-_i: 138.3 ± 3.8 mM; medio 534 mosm/kg de H_2O: 1.89 ± 0.03 kg; 281.0 ± 6.4 mM; 157.0 ± 6.0 mM; 163.8 ± 5.7 mM; medio 822 mosm/kg de H_2O: 1.76 ± 0.04 kg; 418.0 ± 9.8 mM; 123.7 ± 4.8 mM; 239.6 ± 8.1 mM. En presencia de furosemida: medio 260 mosm/kg de H_2O: 2.31 ± 0.04 kg; 133.6 ± 3.10 mM; 170.5 ± 8.0 mM; 106.6 ± 4.2 mM; medio 534 mosm/kg de H_2O: 1.85 ± 0.03 kg; 282.7 ± 4.5 mM; 164.5 ± 9.2 mM; 127.5 ± 5.5 mM; medio 822 mosm/kg de H_2O: 1.35 ± 0.03 kg; 465.7 ± 9.8 mM; 98.1 ± 5.0 mM; 168.7 ± 6.6 mM (medias ± E.E.; n = 20). En presencia de furosemida se observa que: en medio hiposmótico el contenido celular de H_2O es similar al control y el de Na^+ se halla disminuido. En medio hiperosmótico el contenido de H_2O es menor y el de Na^+ se encuentra aumentado. En cambio los contenidos de Cl^- son sistemáticamente menores que en ausencia de furosemida. De la comparación de estos resultados surge que: 1) La regulación del volumen celular en medio hiposmótico es similar y en medio hiperosmótico es menor en presencia del fármaco que en su ausencia. 2) Los flujos de Na^+ en los medios anisosmóticos apa-

recen incrementados con respecto a los controles, lo cual indicaría un aumento de la permeabilidad de la membrana celular al Na^+. 3) Con respecto al Cl^-, los bajos contenidos celulares en todas las osmolaridades y la disminución de los flujos que se producen en medios anisosmóticos en presencia del fármaco, lleva a considerar (si bien es aventurado extrapolar estas observaciones efectuadas a nivel celular al transporte transepitelial sin otras comprobaciones) que la furosemida en lugar de actuar directamente sobre el transporte activo de Cl^- podría disminuir su pasaje transepitelial, por limitar la entrada de dicho ión a las células.

133

Interacción Ca^{++} - Na^+ en el tubo proximal

Cristina E. Carnovale, Alicia Dominighini, Diana Polito, Sara W. de Jairala

Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

En un trabajo anterior se comprobó que cuando se incubaban trozos de corteza renal en un medio hiposmótico obtenido disminuyendo la concentración de NaCl, si se utilizaba una baja concentración de Ca^{++} en el baño, aumentaba el contenido intracelular de Na^+. Estos resultados se interpretaron en base a la teoría de reciente formulación, de que la concentración de Ca^{++} intracelular regula la entrada de Na^+ a las células por el polo apical. En vista de que el medio de incubación empleado, además de tener una baja concentración de Na^+, era hiposmótico con respecto al contenido celular, se consideró necesario discriminar entre efectos producidos por gradientes en la actividad del H_2O y gradientes de concentración de Na^+ entre células y medio extracelular. Para ello, se utilizó en el baño una solución de baja concentración de NaCl que se hizo isosmótica con el medio intracelular por el agregado de manitol, soluto no permeante. Se procedió como en un trabajo anterior preincubando trozos de corteza renal en solución 280 mosm/kg H_2O, a 37° C, en atmósfera de O_2, pH 7.20; $[Na^+]$ 157, 15mM; $[Ca^{++}]$ 2,33 mM; sustratos metabólicos, glucosa y NaAc 10mM, durante 15 minutos. El tejido se transfirió luego a los siguientes medios de incubación: salino isosmótico, $[Ca^{++}]$ 2,33 mM; salino isosmótico, $[Ca^{++}]$ 0,33 mM; hiposmótico $[Ca^{++}]$ 2,33 mM y $[Na^+]$ 86,15 mM; hiposmótico $[Ca^{++}]$ 0,33 mM y $[Na^+]$ 86,15 mM; isosmótico $[Ca^{++}]$ 2,33 mM y $[Na^+]$ 86,15 mM, completando con manitol a 280 mosm/kg H_2O; isosmótico con manitol, similar al precedente, con $[Ca^{++}]$ 0,33 mM. Se obtuvieron contenidos tisulares de H_2O, Na^+ y K^+. El H_2O se valoró por diferencia de peso entre tejido fresco y seco (a 100° C durante 24 hs) y el de Na^+ y K^+ por fotometría de llama. Se utilizó el espacio de inulina como estimación del espacio extracelular y con los contenidos tisulares se calcularon los celulares de: H_2O (kg/kg de tejido seco), Na^+ y K^+ (meq/kg de tejido seco). Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Isosmótico, $[Ca^{++}]$ 2,33 mM; 2,13 $\pm$ 0,04; 95,35 $\pm$ 5,2; 160,5 $\pm$ 2,9. Isosmótico, $[Ca^{++}]$ 0,33 mM: 2,12 $\pm$ 0,03; 99,26 $\pm$ 5,0; 158 $\pm$ 3,0. Hiposmótico, $[Ca^{++}]$ 2,33 mM: 2,58 $\pm$ 0,05; 72,96 $\pm$ 4,0; 162,2 $\pm$ 2,5. Hiposmótico, $[Ca^{++}]$ 0,33 mM: 2,57 $\pm$ 0,05; 93,92 $\pm$ 5,0; 115,8 $\pm$ 3.0. *Interacción Ca - Na:* Isosmótica con manitol, $[Ca^{++}]$ 2,33 mM: 2,03 $\pm$ 0,03; 56,76 $\pm$ 5,0; 149,8 $\pm$ 2,5. Isosmótica con manitol, $[Ca^{++}]$ 0,33 mM: 2,01 $\pm$ 0,03; 73,17 $\pm$ 4,0; 145,5 $\pm$ 2,8 (medias $\pm$ E.S.; n = 16). Se observa que tanto en medio hiposmótico salino como en medio isosmótico con manitol, ambos con $[Na^{++}]$ = 86,15 mM y $[Ca^{++}]$ = 0,33 mM; el contenido celular de Na^+ es significativamente mayor que en los medios similares con $[Ca^{++}]$: 2,33 mM. Eso demuestra que lo que determina el aumento de la entrada de Na^+ a las células cuando la concentración extracelular del Ca^{++} está disminuida, es la baja concentración de Na^+ del baño y no su hiposmolaridad.

134

Regulación del volumen celular. Influencia del bicarbonato en el medio de incubación

Marta Rasia, María I. Spengler, José Luis Bossi, Sara W. de Jairala

Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

El transporte transepitelial de Na^+ está estrechamente relacionado al transporte de bicarbonato en el túbulo proximal renal pero aún se investiga la vinculación que existe entre ellos. En este trabajo estudiamos el efecto del bicarbonato sobre la regulación del volumen celular como otro enfoque del planteo anterior. El modelo experimental utilizado, similar al de trabajos presentados anteriormente consistió en incubar cortes de corteza renal de perro en soluciones Ringer de distintas osmolaridades obtenidas modificando la concentración de NaCl: un medio isosmótico normal 282 mosm y 2 medios anisosmóticos: 155 mosm (hiposmótico) y 528 mosm (hiperosmótico) a 37° C y en atmósfera de O_2. Al cabo de 60 minutos los cortes de tejido fueron extraídos y se analizaron sus contenidos de agua, Na^+. K^+ y Cl^-. Paralelamente se estimó el espacio extracelular que se utilizó para calcular los contenidos intracelulares de agua e iones. Según nuestras conclusiones previas, obtenidas incubando en Ringer Cl^-, el volumen celular en medios anisosmóticos es principalmente regulado por un flujo de iones Na^+ y Cl^- que arrastra agua, en el sentido previsto por la composición del medio. En el presente trabajo se repitió el modelo experimental utilizando un grupo similar de medios en los que se reemplazaron 25 mM de iones cloruro por bicarbonato. En esas condiciones observamos que: la presencia de bicarbonato en el medio determina un mayor contenido celular de agua y Na^+ en todas las osmolaridades ($p < 0{,}01$) sin modificación significativa de los contenidos de Cl^- y K^+ ($p > 0{,}5$). La transferencia de tejido del medio iso al hiposmótico provoca en presencia de bicarbonato una pérdida mayor de Na^+ pero similar de Cl^- con una modificación significativamente menor del contenido de agua. Variaciones por kg de peso seco: Ringer Cl^-: Δ Na^+ = 36,4 mM; Δ Cl^- = 15,1 mM; Δ H_2O = 0,44 kg. Ringer CO_3H^-: Δ Na^+ = 55,5 mM; Δ Cl^- = 16,0 mM; Δ H_2O = 0,25 kg. La transferencia de tejido del medio iso al medio hiperosmótico manifiesta, en presencia de bicarbonato un ingreso aumentado de iones Na^+ pero similar de iones Cl^- con un mejor ajuste del contenido de agua. Variaciones por kg de peso seco: Ringer Cl^-: Δ Na^+ = 133,8 mM; Δ Cl^- = 76,8 mM; Δ H_2O = 0,22 kg. Ringer CO_3H^- = Δ Na^+ = 158,7 mM; Δ Cl^- = 79,2 mM; Δ H_2O = 0,13 kg. La interpretación de estos resultados nos conducen a proponer que el bicarbonato adicionado al medio accede a las células por el polo peritubular (permeable a estos iones) y en ellas origina un aumento de la permeabilidad de la atmósfera al Na^+ sin modificar la permeabilidad al Cl^-. Este efecto explica que: En medio isosmótico el contenido celular de iones esté elevado (Na^+ y CO_3H^-) y consecuentemente lo esté también el de agua. En los medios anisosmóticos haya una transferencia adicional de iones Na^+ (posiblemente acompañados por aniones CO_3H^-) sin modificarse el movimiento de Cl^-. Por tanto la regulación del volumen celular es más eficiente en presencia de CO_3H^- y este efecto se resalta en medio hiposmótico en el cual la salida de iones está favorecida por el aumento de la permeabilidad y la estimulación del bombeo activo ocasionada por el elevado contenido celular de Na^+.

135

Vasodilatación renal de esfuerzo en hipertensos tratados con Captopril

S. Finkielman, Susana M. Dabsys, Victoria E. Soroa, H. A. Calbosa, V. E. Nahmod

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Se desconoce si la generación de angiotensina en la circulación juega algún papel regulador fisiológico fuera de las deficiencias de sodio. El hecho de que el sistema renina-angiotensina se active al pasar del decúbito al ortotatismo o durante el ejercicio, probablemente como consecuencia *a*) de una mayor carga simpática, y *b*) de una disminución del flujo sanguíneo renal, indicaría alguna participación en la homeostasis circulatoria. Recientemente hemos observado que, en hipertensos esenciales, el bloqueo crónico de la generación de angiotensina II mediante el inhibidor

de la enzima conversora, captopril, que induce elevada actividad renínica plasmática (ARP), produce un descenso de la misma durante el esfuerzo de la marcha. Dado que la marcha determina hiperactividad simpática se propuso que el descenso de la ARP se debería a una vasodilatación renal. Por otra parte se ha demostrado un aumento agudo del flujo sanguíneo renal (FSR) por Captopril en hipertensos en reposo. Con el objeto de establecer el efecto del captopril en los cambios de FSR renal provocados por la marcha en hipertensos esenciales, a 4 pacientes de ambos sexos de 24 a 44 años con hipertensión leve, no tratados y a 4 pacientes de ambos sexos con hipertensión moderada tratados con captopril, 150 mg/día, por más de seis meses, cuyas presiones eran normales en el momento del estudio, se les efectuó mediciones del flujo plasmático renal efectivo (FPRE) durante una hora en decúbito supino y durante 30 minutos de marcha en un treat-mill a 1,5 millas/hora. Los pacientes recibían dieta libre con 100 mEq/día de Na. El FPRE se determinó mediante el método de la inyección única (50 μCi de Hipurán-^{131}I), obteniéndose muestras después de los minutos 1, 5, 10, 20, 30 y 60 de la inyección durante el decúbito; tras 90 minutos y durante la marcha se efectuó una nueva inyección obteniéndose muestras en los minutos 1, 5, 10, 20 y 30. La presión arterial de los hipertensos controles fue 148 $\pm$ 4/98 $\pm$ 5 mmHg en reposo; la sistólica ascendió 15 $\pm$ 3 mmHg ($p < 0.01$) en tanto que la diastólica no mostró cambios significativos. La presión media ascendió 13 $\pm$ 5 mmHg ($p < 0.05$). El FPRE fue 455 $\pm$ 4 ml/min en reposo y descendió 119 $\pm$ 43 ml/min ($p < 0.05$) en el esfuerzo. La resistencia renal calculada ascendió 6.058 $\pm$ 2.024 dinas.seg.cm^{-5} ($p < 0.05$). En los hipertensos con captopril la presión en decúbito fue 120 $\pm$ 6/82 $\pm$ 1 mmHg; la sistólica ascendió 27 $\pm$ 7 mmHg ($p < 0.01$) y la diastólica descendió 11 $\pm$ 7. No hubo cambios de la presión media. El FPRE de reposo fue 427 $\pm$ 43 ml/min y ascendió 74 $\pm$ 18 ml/min durante el esfuerzo ($p < 0.01$). La resistencia renal descendió 1.656 $\pm$ 690 dinas.seg.cm^{-5} ($p < 0.05$). En síntesis, los hipertensos controlados mediante captopril aumentaron el FPRE durante el esfuerzo en tanto la resistencia renal descendió.

136

Inhibición de la generación de angiotensina encefálica y sistémica y vagotomía en hipertensión neurogénica experimental

R. I. Kuszniecki, V. E. Nahmod, S. Finkielman

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La descentralización del barorreceptor o la abrupta disminución de la tensión de la pared vascular por ligadura de ambas carótidas comunes produce ascensos prolongados de la presión arterial. Estos preparados constituyen uno de los modelos experimentales de hipertensión neurogénica. El objeto primario de este proyecto fue determinar si el sistema renina-angiotensina encefálico juega algún rol en el mantenimiento de la hipertensión en el preparado de carótidas obstruidas. Para ello, perros cuyas carótidas habían sido ligadas 7 días antes del procedimiento experimental fueron sometidos a una infusión intracerebroventricular (ICV) de captopril, droga que inhibe la producción de angiotensina II. Se emplearon perros de 6 a 12 kg, anestesiados con cloralosa (100 mg/kg) que fueron trepanados para permitir la infusión continua de soluciones de LCR artificial; la presión arterial y el pulso se registraron en forma continua. Los nervios vagos fueron reparados y oportunamente seccionados, observándose la respuesta presora. Se estudiaron 6 grupos de animales: 1) un grupo de 5 perros con carótidas ligadas a los que se infundió solución de LCR artificial ICV (20 μl/min); a los 60 minutos se seccionaron los nervios vagos y la presión arterial continuó registrándose durante 1 hora más. 2) Un grupo de 6 perros a los que se aplicó un protocolo similar salvo que, disuelto en el LCR artificial, se infundió captopril (2 μg/min). 3) Un grupo control de 6 perros normotensos (sin carótidas ligadas) siguiendo el mismo protocolo: infusión de LCR artificial y sección de vagos. 4) Un grupo similar de 3 pe-

rros normotensos con infusión ICV de captopril. 5) Un grupo de 3 perros con carótidas ligadas, a los que se inyectó captopril endovenoso (0.5 mg/kg). 6) Un grupo de 3 perros con carótidas ligadas nefrectomizados 24 horas antes del procedimiento experimental a los que se inyectó captopril endovenoso. Resumiendo, se observó: 1) El captopril agudamente infundido en los ventrículos cerebrales no afecta la presión arterial elevada por ligadura de carótidas, a la dosis utilizada durante el tiempo observado. 2) El ascenso persistente de la presión arterial producido por la sección de los vagos es bloqueado por la infusión ICV aguda de captopril. Después de un breve ascenso, la presión arterial cae a valores de normotensión o aún más bajos. 3) La infusión de captopril ICV en perros normotensos reduce y acorta la respuesta presora a la sección vagal. 4) La inyección endovenosa de captopril en perros con hipertensión neurogénica produce un descenso inmediato de la presión arterial a valores normales durante los siguientes 180 minutos. 5) La nefrectomía previa, sin embargo, afecta poco a la presión arterial de perros con ligadura de carótidas y el captopril administrado por vía endovenosa carece ahora de efecto. En conclusión, en la hipertensión neurogénica por ligadura de carótidas el sistema renina-angiotensina renal se encuentra activado y parece ser el efector responsable de ajuste presor a niveles altos. Sin embargo, como a las 24 horas de la nefrectomía la hipertensión persiste, otros mecanismos deben intervenir, puestos en juego en ausencia de hiperreninemia. Estos mecanismos parecen desencadenarse en forma refleja y sus aferencias serían vagales. Entre las interacciones bioquímicas centrales que ponen en conexión las aferencias vagales con eferencias simpáticas o neuroendocrinas, responsables de la hipertensión, el sistema renina-angiotensina encefálico tiene una participación importante.

137

Influencia de las vías noradrenérgicas y serotoninérgicas ascendentes en la regulación de la presión arterial

E. Benarroch, S. Finkielman, V. E. Nahmod

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El papel de los neurotransmisores centrales en la regulación de la presión arterial (PA) no está definitivamente aclarado. Hay evidencias de que la administración de serotonina (5-HT) y noradrenalina (NA) en el área preóptica hipotalámica (POH) produce, respectivamente, un ascenso y descenso de la presión arterial. Estos experimentos farmacológicos, sin embargo, no permiten establecer el papel de los sistemas monoaminérgicos ascendentes en la regulación cardiovascular. Como aproximación al problema, se utilizaron ratas Wistar macho de 250-350 gr que fueron divididas en tres grupos experimentales: Grupo I (n = 9) sometidas a descentralización barorreceptora según la técnica de Krieger. Ratas con operación simulada (sham n = 7) sirvieron como su control. Grupo II (n = 10): ratas con descentralización barorreceptora a quienes, dos días antes de esta intervención, se les destruyó la vía serotoninérgica ascendente hacia el área preóptica mediante administración esterotáxica de 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT 5 μg bilateral) en el fascículo proencefálico medial. El grupo fue controlado con ratas sham a quienes se administró 5,7-DHT (n = 7) y ratas sham que recibieron vehículo en el fascículo proencefálico medial (FPM) (n = 6). Por último, un grupo de ratas (Grupo III, n = 10), recibió esterotáxicamente inyecciones bilaterales de 6-hidroxidopamina (6-OHDA, 5 μg) en la vía noradrenérgica ventral (VNV), con el objeto de deplecionar al área preóptica de este neurotransmisor. Ratas controles recibieron vehículos en la VNV (n = 8). Siete a diez días posteriores a estas manipulaciones experimentales las ratas, fueron anestesiadas con pentobarbital y canuladas en la arteria femoral para el registro de la presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardíaca (FC). Al final de los experimentos se efectuó la determinación fluorométrica de 5-HT y NA en el hipotálamo anterior a fin de controlar la eficacia de las lesiones. La PAM basal no mostró diferen-

cias significativas entre las ratas sham (105 ± 5 mmHg) y las que recibieron vehículo en el FPM o en la VNV. En ratas sham con 5,7-DHT en el FPM la presión fue discreta y no significativamente menor que en los animales anteriores. Las ratas del grupo I mostraron una PAM basal significativamente mayor que sus controles (150 ± 18 mmHg, $p < 0.01$). En ratas pretratadas con 5,7-DHT (grupo II), en cambio, el ascenso tensional a los 7 días de descentralización fue leve y no significativo respecto a los controles (115 ± 5 mmHg). En las ratas del grupo III se observó un ascenso significativo de la PAM respecto de las que recibieron vehículo en la VNV (145 ± 10, $p < 0.01$). Estos resultados muestran que la depleción de serotonina en el área preóptica enmascara el desarrollo de hipertensión por descentralización barorreceptora y que la destrucción de la proyección noradrenérgica en dicha área produce un incremento significativo de la presión arterial. En base a estos elementos puede sugerirse que: *a*) mecanismos serotoninérgicos centrales participan en el desarrollo de un modelo clásico de hipertensión neurogénica, como es la obtenida por denervación barorreceptora, y *b*) sistemas noradrenérgicos ascendentes hipotensores, integrados a nivel hipotalámico, actúan en la regulación de la PA en condiciones basales. La hipertensión por destrucción de la vía noradrenérgica ventral puede proponerse, por lo tanto, como un nuevo modelo experimental de hipertensión neurogénica en la rata.

138

Estudio de factor reumatoideo en suero y saliva de pacientes con síndrome de Sjögren y en otras enfermedades. Estudio preliminar

R. Vallés, R. Abaurre, Elcira Maneschi, I. Rivero

Cátedra de Clínica Médica II, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza

El factor reumatoideo clásico es una inmunoglobulina M con actividad anti IgG. Esta determinación suele ser positiva principalmente en enfermedades del tejido conectivo y en otras patologías no relacionadas. Aparentemente se origina por formación o desenmascaramiento de determinantes antigénicos sobre la molécula de IgG. En el síndrome de Sjögren alrededor del 90 % de los enfermos poseen actividad de factor reumatoideo en suero y se ha descripto la síntesis de éste por linfocitos que infiltran las glándulas salivares (Talal, 1972). Dado que no se ha descripto su presencia en saliva y que se desconoce el destino del sintetizado por las células que infiltran las glándulas salivares, en el síndrome de Sjögren, nos pareció interesante estudiarlo en este líquido biológico. El diagnóstico de síndrome de Sjögren se estableció por la anamnesis, examen clínico y de laboratorio (test de Shirmer y tinción con Rosa de Bengala). Hasta el presente, se han estudiado 2 enfermos con síndrome de Sjögren, uno primario y otro secundario; 2 enfermos con enfermedades del colágeno sin afectación de glándulas salivares y 2 enfermos con actividad de factor reumatoideo en suero por otras patologías (endocarditis bacteriana subaguda). Se comparó con un grupo control de edad y sexo similar. La presencia de factor reumatoideo en suero se determinó en forma semicuantitativa mediante la prueba con partículas de látex recubiertas con IgG humana. Se dosó en suero y saliva parotídea obtenida por canulación del conducto de Stenon. Los pacientes con afectación de las glándulas salivares (síndrome de Sjögren primario y secundario), presentaron actividad de factor reumatoideo en saliva en diluciones de hasta 1:160 (suero 1:1280 en ambos casos), mientras que en los enfermos con colagenopatías sin afectación glandular y los afectados de endocarditis bacteriana subaguda, a pesar de tener altos títulos en suero (hasta 1:10240), no se detectó factor reumatoideo en saliva. En el grupo control la determinación fue negativa, tanto en suero como en saliva.

139

Glándulas parótidas en normales y en pacientes con hiperlipemia. Estudio estructural

R. S. Piezzi, R. Abaurre, J. Vega

Instituto de Histología y Embriología y Cátedra de Clínica Médica II, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza

En estudios anteriores se ha demostrado la existencia de una mayor prevalencia de alteraciones metabólicas, hiperlipemia, intolerancia a los carbohidratos e hiperuricemia en pacientes con agrandamiento bilateral de parótidas (ABP). Con el objeto de correlacionar estas observaciones clínicas con las histopatológicas, muestras de tejidos parotídeos de sujetos normales (2 mujeres y 4 varones de edades entre 13 y 45 años) y de pacientes con ABP (5 mujeres y 10 varones, de edades entre 33 y 70 años) fueron obtenidas por punción biopsia, según técnica descripta anteriormente. Todos los pacientes estudiados tenían hiperlipemia tipo IV de Fredrickson. Los cilindros de tejidos fueron fijados y procesados para microscopía óptica de rutina, histoquímica para lípidos y microscopía electrónica de transmisión. Las observaciones realizadas en las glándulas de los controles demuestran la presencia de tres porciones histoarquitecturalmente distintas: ácinos, conductos intercalares y estriados. Entre ellos se observan finos tabiques conectivos con relativa cantidad de gotas lipídicas intersticiales. Las células acinosas son piramidales, poseen un núcleo basal y un desarrollado reticuloendoplásmico rugoso y abundantes ribosomas libres. El polo apical o secretor posee la mayor concentración de gránulos cromófilos, redondos u ovales, en los cuales se observa en la micriscopía electrónica un compartimiento homogéneo y un material condensado de ubicación central o periférico. Se observa además microcuerpos claros y densos, vacuolas irreguales y vacuolas de condensación. Los conductos estriados presentan pliegues basales, numerosas mitocondrias y medios de unión apicales. Las células acinosas y las de los conductos no muestran inclusiones lipídicas. Las parótidas de los pacientes con ABP muestran: 1) áreas acinosas normales en vecindad de otras con distintos grados de inclusiones lipídicas de ubicación perinuclear. La densidad de estas inclusiones es heterogénea y sus tamaños son variables; desde pequeñas gotas perinucleares hasta medianas gotas coalescentes que se distribuyen en la totalidad del citoplasma: 2) la cantidad de gránulos secretores disminuyen con respecto a los controles; 3) en algunas parótidas la región apical de las células epiteliales de los conductos estriados muestra alteraciones con destrucción parcial del citoplasma y numerosas gotas semejantes a cuerpos lipídicos. Se observa además detritus celulares y glóbulos lipídicos en su porción luminal. El hallazgo de abundantes inclusiones lipídicas en las parótidas de los pacientes con ABP sugeriría un metabolismo celular alterado en respuesta a los trastornos en el metabolismo de los lípidos.

140

Efecto de la simpatectomía química por 6 OH-dopamina en el desarrollo de hipertensión renal experimental y en la distribución de noradrenalina en el sistema nervioso central de la rata

María Luisa Kurnjek, Nidia Basso, A. C. Taquini

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El presente trabajo fue diseñado con el objeto de esclarecer la participación del sistema nervioso central (SNC) y periférico en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión renovascular por isquemia renal bilateral en la rata utilizando la simpatectomía química por 6 hidroxidopamina (6 OHDA) en animales neonatos. El desarrollo de la hipertensión y los cambios en el sistema simpático periférico en estos animales fueron analizados en un trabajo anterior (Kurnjek ML et al *Medicina* (*Bs Aires*) 40: 769, 1980). En dicha publicación se describió la metodología empleada para obtener la simpatectomía química y el desarrollo de hipertensión; en este trabajo describiremos los resultados correspondientes

al análisis de la distribución de noradrenalina en el SNC. La mitad de los animales fueron tratados con 6 OHDA (GT) y el resto quedó como control (GC). Entre la 10ª y la 12ª semana de vida (250 g de peso) se les colocó un clip de plata de 0.25 mm de luz a 20 animales del GC (GC) y a 23 animales del GT (GTC) se realizó una operación simulada en 20 ratas del GC (GCS) y en 20 del GT (GTS). Simultáneamente se demedularon y denervaron ambas glándulas adrenales en todos los animales tratados para eliminar el efecto de las catecolaminas circulantes. Se registró la presión arterial (PA) semanalmente durante 8 semanas al cabo de las cuales los animales fueron sacrificados por dislocación cervical procediéndose al lavado del SNC con 20 ml de solución fisiológica fría a través de la aorta torácica. Se separaron las cabezas y se extrajo el SNC separándose las siguientes zonas: hemisferios cerebrales, cerebelo, bulbo, tallo cerebral, hipotálamo, glándula pineal, neuro y adenohipófisis. Los tejidos fueron homogeneizados en solución de ácido perclórico 0.4 N con 0.2 % de EDTA y 0.05 % de SO_3Na_2, y en los sobrenadantes se determinó el contenido de noradrenalina (NA) con el método fluorométrico de Laverty y Taylor. Los resultados mostraron que la PA inicial de los animales tratados era significativamente menor que la de los controles (GT: 78.9 $\pm$ 1.8 mm Hg; GC: 109.9 $\pm$ 1.5 mm Hg; $p < 0.0005$). Luego de producir la isquemia renal bilateral el incremento tensional fue de igual magnitud (60 mm Hg) tanto en los animales tratados como en los controles. El tratamiento con 6 OHDA produjo un descenso significativo de la NA en el cerebelo (– 30 % $p < 0.0005$) y un incremento en bulbo (+ 58 %, $p < 0.002$) y en tallo cerebral (+ 106 %, $p < 0.0005$). La colocación de los clips en los animales tratados determinó un descenso significativo de la NA en el cerebro (– 34 %, $p < 0.0005$), en el cerebelo (– 30 %, $p < 0.002$) en el bulbo (– 32 %, $p < 0.01$) en el tallo cerebral (– 46 %, $p < 0.0005$) y en el hipotálamo (– 35 %, $p < 0.002$). Por otra parte la isquemia renal bilateral en los animales controles no tratados determinó una caída significativa de la concentración de NA en el tallo cerebral (– 30%, $p < 0.002$); en las demás zonas del SNC se observó también una tendencia al descenso de la concentración de NA sin alcanzar significación estadística. No se registraron cambios en la neuro y adenohipófisis entre los distintos grupos, mientras que la concentración de NA en las pineales de los animales tratados disminuyó un 40 % con respecto a los controles. Los resultados descriptos sugieren que el tratamiento con 6 OHDA produce un incremento en la concentración de NA en algunas regiones del SNC posiblemente por regeneración y crecimiento colateral de las terminales noradrenérgicas.

141

Participación de la expansión hidrosalina y la angiotensina II en la fase inicial de la hipertensión por isquemia renal bilateral

María Inés Rosón, Silvia Morera, I. J. de la Riva

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Previamente hemos observado retención hidrosalina y actividad renínica plasmática normal en los primeros 10 días de la hipertensión por isquemia renal bilateral (*Hypertension* 1981, en prensa). El hecho configuraría una relación inapropiada entre ambos factores. En el presente trabajo se trató de evitar la retención de sodio e inhibir la formación de angiotensina II. Se utilizaron ratas macho Wistar CHbb THOM (250 g en el momento de la inserción del clip). En todos los animales se insertó un clip de plata (0.24 mm de luz) en ambas arterias renales. Las ratas fueron estudiadas en jaulas metabólicas para observar el desarrollo de hipertensión arterial, el balance de agua y sodio y la excreción urinaria de calicreínas (C) (Unidades Esterásicas/24 h/ratas, UE) en un período control de 3 días previos a la inserción del clip v durante los 10 días posteriores a la isquemia renal. Se registró la presión arterial indirecta (PA) mediante un transductor de pulso conectado a un polígrafo Grass. Hasta el momento actual se analizaron los siguientes grupos: GI) 7 ratas, con dieta hiposódica (Na < 14

mEq/kg), GII) 6 ratas, con dieta normosódica (Na 100 mEq/kg), GIII) 8 ratas, dieta hiposódica (Na < 6 mEq/kg) más captopril (SQ 14225) 80 mg/kg/día, GIV) 7 ratas, dieta normosódica (Na 100 mEq/kg) más captopril. En SQ 14225 se administró por vía oral. Los animales del GI y GII mostraron un desarrollo similar de hipertensión arterial ($p < 0.001$); 10 días después del clip: (GI (7) Δ 33 ± 3 mm Hg, GII (6) Δ 38 ± 8 mm Hg; a los 23 días: GI (7) Δ 65 ± 7 mm Hg, GII (6) Δ 51 ± 7 mm Hg. El captopril inhibió el desarrollo de hipertensión en los 2 animales del GIII que sobrevivieron (10 días post-clip Δ −15 y −20 mm Hg, 23 días Δ −20 y −30 mm Hg, 31 días Δ −5 y −15. Los restantes 6 animales de este grupo murieron en los días inmediatos a la colocación del clip en anuria u oliguria severa con o sin hematuria. El captopril en el GIV produjo cambios NS de la PA a los 10 días (Δ + 19 ± 7, 5 ratas) y a los 23 días (Δ + 18 ± 7, 5 ratas) que fueron significativos a los 31 días (Δ + 26 ± 14 mm Hg, 5 ratas, $p < 0.02$). En los primeros 3 días post-clip el GI presentó análoga retención de agua a la del GII (2.4 ± 0.6 (5) y 1.8 ± 0.3 (5) ml/100 g/día) pero una significativa menor retención de sodio (40 ± 17 (6) y 216 ± 9 μEq/100 g/día (5), $p < 0.001$). Las 2 ratas del GIII no retuvieron agua ni sodio. El GIV no retuvo agua pero retuvo significativamente más sodio ($p < 0.05$). Tal como fue observado en el trabajo anterior, los valores de excreción urinaria de C descendieron en los 4 grupos con respecto al control, el segundo día después del clip, pero las diferencias fueron significativas sólo en GIV (GI: −13.9 ± 7.0 UE (7); GII: −5.5 ± 5.1 UE (6); GIII: −43.8 ± 1.2 UE (2); GIV: −21.1 ± 3.2 UE (6) $p < 0.01$). Se concluye que la administración de captopril retarda pero no suprime el desarrollo de hipertensión por isquemia renal bilateral· sin embargo, la oferta simultánea de una dieta hiposódica inhibe la hipertensión en este modelo. El comportamiento semejante de las C después de la inserción del clip en las ratas con y sin captopril indicaría que la participación de las mismas sería similar en ambos casos en el período post-clip inmediato.

142

Ritmo circadiano y control simpático de la enzima de conversión de la angiotensina I de la glándula pineal de la rata

María S. Balda, C. J. Pirola, P. V. Gejman, Susana M. Dabsys, S. Finkielman, D. P. Cardinalli, V. E. Nahmod

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina y CEFAPRIN, Buenos Aires

La enzima de conversión de la angiotensina I (ECA) es una dipeptidil hidrolasa cuya distribución es ubicua dado que ha sido encontrada en las células endoteliales vasculares, epiteliales y en la fracción microsomal de distintas estructuras del sistema nervioso central. La glándula pineal es un órgano inervado por fibras simpáticas que se originan en el ganglio cervical superior, el flujo nervioso de estas estructuras regula la síntesis de melatonina, su secreción y sus variaciones circadianas. Como todos los componentes del sistema renina-angiotensina han sido descriptos en la glándula pineal, nos pareció oportuno estudiar en un sistema simple las variaciones de la ECA y su sustrato natural de angiotensina I, en períodos de luz (mínima actividad adrenérgica) y en períodos de oscuridad (máxima actividad adrenérgica). Se tomó como control para la ECA la hipófisis. Se usaron ratas Wistar de peso entre 200 y 250 g, mantenidas desde el nacimiento con ciclos de luz-oscuridad 12 : 12, siendo el período de oscuridad de 1800 a 600 h. Los animales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se extrajo la glándula pineal y la hipófisis, las que se congelaron a − 70° C hasta efectuar las determinaciones. Las muestras fueron tomadas en distintos tiempos: 500, 900, 1700, 2100 y 100 h. La actividad de la ECA se determinó por el método de Silverstein y Frieldand modificado para tejidos. La ECA se caracterizó con el sustrato sintético hipuril-histidil-leucina, obteniéndose un Km = 1.3 mM, e inhibida por SQ 14225, obteniéndose un Ki = 1.1 nM. La angiotensina I de la glándula pineal fue determinada por radio inmunoensayo. En la glándula pineal la actividad de la ECA expresada en nmoles de histidil-leucina/mg proteína min, fue: a las 500 h, 0.49 ± 0.16: a las 900 h, 0.66 ±

0.10; a las 1700 h, 2.92 ± 0.48; a las 2100 h, 1.23 ± 0.06, y a las 100 h, 0.77 ± 0.22· el análisis de varianza mostró diferencias significativas ($p < 0.005$). En la hipófisis, a las 500 h, la actividad fue 6.98 ± 0.99; a las 900 h, 8.35 ± 0.77; a las 1700 h, 7.70 ± 0.73; a las 2100 h, 7.84 ± 0.54, y a las 100 h, 8.88 ± 0.65; el análisis de varianza demostró ausencia de diferencias significativas. El contenido de angiotensina I de la glándula pineal expresado en pg/pineal, fue: a las 900 h, 11.5 ± 1.2; a las 1700 h, 3.00 ± 0.43; a las 2100 h, 11.0 ± 1.8, a las 100 h, 22.5 ± 3.1, v a las 500 h, 9.0 ± 1.1. Se observó un desplazamiento de 8 h entre el pico máximo de contenido de angiotensina I (sustrato natural de la enzima) y la actividad máxima de la ECA de la glándula pineal. No se observó ritmo circadiano para la ECA de la hipófisis. En un trabajo anterior se observó aumento de la actividad de la ECA de la glándula pineal por gangliectomía cervical superior bilateral. Para determinar qué clase de receptor adrenérgico podría estar involucrado en este fenómeno se trató a ratas gangliectomizadas con isoproterenol (5 mg/kg), las que se sacrificaron 5 h después; para ratas gangliectomizadas se obtuvo una actividad de ECA de 11.72 ± 0.36 y para ratas gangliectomizadas tratadas con isoproterenol de 0.63 ± 0.25 umoles de histidil-leucina/mg proteína/min. Estos resultados indican que los receptores beta-adrenérgicos inhiben la actividad de la ECA de la glándula pineal y sugieren que la noradrenalina podría jugar un papel importante en la regulación de la ECA a través de los receptores beta-adrenérgicos por un mecanismo de retroalimentación negativo.

143

Efectos de la ciproheptadina sobre la secreción de tirotrofina (TSH) y prolactina y su respuesta a la TRH en el hombre

R. E. Beretervide, Liliana Contreras, Silvia Bosco, J. C. Scornavacchi, A. A. Zaninovich

Laboratorio de Investigaciones Endocrinológicas, CONICET, Centro de Medicina Nuclear, 4ta. Cátedra de Medicina, Hospital de Clínicas José de San Martín y Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires

La ciproheptadina, un antagonista de la serotonina, tiene un efecto supresivo sobre la secreción de algunas hormonas de la hipófisis. Así, se observó que este compuesto suprime marcadamente la secreción de ACTH en pacientes con enfermedad de Cushing o con el síndrome de Nelson, seguido de mejoría clínica de la enfermedad. También se observó que el aumento de la somatotrofina producida por la hiperglucemia o por la L-Dopa es suprimido por la ciproheptadina. En relación con el eje tiroideo no se ha determinado aún si existe un efecto definido. Estudios de este laboratorio mostraron que la ciproheptadina mejora el cuadro clínico en el hipertiroidismo (Zaninovich et al, *Proc Amer Thyroid Asoc*, Chicago, 1969) aunque la TSH no puede estar involucrada en este efecto por estar suprimida su secreción. En el presente trabajo se estudió en 20 adultos y 6 niños normales de 6 a 11 años de edad si la ciproheptadina modifica la secreción de TSH y prolactina, o su respuesta a la TRH. Previa extracción de una muestra basal de sangre, se inyectó por vía iv una dosis de 200 μg de TRH, obteniéndose muestras de sangre a los 20 y 40 minutos posteriores a la inyección. A continuación se medicó a los adultos con 8 mg/día y a los niños con 4 mg/día de ciproheptadina por vía oral durante 7 días, repitiéndose la prueba de TRH previa ingestión de una dosis de este compuesto una hora antes de iniciar la prueba. Se midieron por radioinmunoanálisis las siguientes hormonas séricas: tiroxina (T4), triiodotironina (T3), TSH y prolactina. Resultados: Adultos: TSH basal 3.6 ± 1.0 μU/ml, incremento a los 20 min post-TRH 5.6 ± 2.6 veces. Luego de administrar ciproheptadina estos valores fueron, respectivamente, 4.0 ± 1.2 μU/ml y 5.5 ± 2.9 veces. No hubo diferencias significativas. En los niños tampoco se observó un efecto sobre la secreción de TSH o respuesta a la TRH, siendo los valores basales de 5.0 ± 1.0 μU/ml y el incremento post-TRH de 3.4 ± 0.6 veces. La T4 basal en los adultos fue de 10.0 ± 1.7 μg/dl y la T3 153 ± 66 ng/dl y no se modificaron luego del tratamiento. En cuanto a la prolactina, los adultos tuvieron un valor basal de 13.7 ± 8.1 ng/ml y a los 20

min post-TRH el incremento fue de 6.0 ± 2.7 veces. Estos valores no se modificaron significativamente con la ciproheptadina. Cabe indicar que aunque las muestras post-TRH preceden al pico de máxima respuesta a la somatotrofina observado en pacientes con acromegalia, se midió igualmente esta hormona en la muestra de 40 min post-TRH. De los 20 sujetos normales, sólo 3 tuvieron respuesta muy marcada a la TRH, con un basal de 0.5 ± 0.5 y un valor post-TRH de 20.8 ± 9.0 ng/ml. Esta hiperrespuesta fue suprimida por la ciproheptadina en los 3 sujetos. Conclusión: A diferencia de lo que sucede en los casos de hipersecreción de ACTH y STH, el presente trabajo no indica que la ciproheptadina actúe sobre la secreción de TSH o prolactina.

144

Efecto de los estrógenos sobre los receptores citoplasmáticos y nucleares de la hipófisis anterior de rata

Graciela E. Alonso, Claudia Weiss, J. A. Burdman, Irene Szijan

Cátedra de Química Biológica Patológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Se observó que un aumento en la secreción de prolactina, provocado por un estímulo fisiológico o farmacológico, produce un aumento en la síntesis de ADN hipofisario. En este mecanismo cumplen una función específica los estrógenos, ya que este incremento en la replicación de ADN es anulado por una droga antiestrogénica. El objetivo de nuestra investigación es aclarar el mecanismo de acción de los estrógenos y el papel que cumplen los receptores de esta hormona en la hipófisis, en las diferentes condiciones en que se observa un cambio en la proliferación celular hipofisaria. Para ello se determinaron las condiciones óptimas para el ensayo de los receptores a estradiol en el citosol y núcleos de la adenohipófisis (resultados publicados). El propósito de este trabajo es estudiar el cambio que se produce en los receptores bajo la acción de elevados niveles de estrógenos circulantes durante diferentes tiempos de tratamiento. El método utilizado para medir receptores consiste en lo siguiente: se extrae la adenohipófisis de rata Wistar tratada o no con estrógenos, se homogeneiza en buffer y se obtienen las fracciones de núcleos y citosol. Una alícuota de 150 μg de proteína de cada una de estas fracciones se incuba en presencia de (^{3}H) estradiol 1 nM con o sin el agregado de 500 veces su concentración de estradiol frío (para determinar la unión inespecífica), primero 1 h a 0° y luego 30 min a 20° C el citosol y 45 min a 30° C los núcleos. Se separa el complejo receptor-(^{3}H) estradiol por precipitación del citosol con sulfato de protamina y por centrifugación de los núcleos y se extrae el (^{3}H) estradiol unido con etanol para determinar su radiactividad. El efecto de la administración de estrógenos sobre los niveles de sus receptores a diferentes tiempos es el siguiente: los receptores citoplasmáticos se mantienen igual al control después de una hora del tratamiento (32 fmoles/mg prot), disminuyen marcadamente a las 2 h (11 fmoles) y recién a las 24 h hay un leve aumento (19 fmoles). En los tratamientos crónicos de 21 a 45 días (en los cuales los estrógenos se administraron semanalmente) los receptores permanecen muy bajos (10 y 6 fmoles). En los núcleos ocurre un aumento en la unión de (^{3}H) estradiol ya a los 30 min (27 fmoles) con respecto al control (8 fmoles), y se acentúa a las 2 h (45 fmoles); a las 14 h empieza a disminuir (18 fmoles) y en los tratamientos crónicos se mantiene alta (34 fmoles). Hay un aumento en los receptores totales (citoplasmáticos y nucleares) con respecto a las ratas control (36 fmoles), que es mayor en las primeras 3 h (50-56 fmoles) y luego se mantiene estable (40-44 fmoles). Conclusiones: Niveles elevados de estrógenos producen en los receptores los siguientes cambios: 1) translocación de receptores del citoplasma al núcleo, que se observa ya a los 30 min (el número de receptores nucleares está muy aumentado, aunque en el citosol no se ve disminución); 2) síntesis de nuevos receptores, dado que están aumentadas los totales, esto es observable a los 30 min y es la razón por la cual no hay disminución en los receptores citoplasmáticos durante las primeras 2 h. Esta es-

timulación de la síntesis es mayor en las primeras 3 h; 3) la prolongada exposición a los altos niveles de estrógenos determina un cambio en la distribución entre el citoplasma y el núcleo, que permanece así mientras las células hipofisarias están en presencia de los estrógenos. También se produce un aumento en el número total de receptores, que permanece constante durante todo el período de tratamiento, debido a que llega a un estado estacionario.

145

La relación entre la liberación de prolactina, la síntesis de ADN y el crecimiento de la hipófisis de la rata: efecto de estrógenos y sulpirida

GRACIELA A. JAHN, GLORIA A. MACHIAVELLI, LILIANA E. KALBERMANN, J. A. BURDMAN

Cátedra de Química Biológica Patológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Se observó que los cambios en la liberación de prolactina están asociados a variaciones en la síntesis de ADN hipofisario. Por ejemplo en las ratas F 344 a las cuales se les provocó un adenoma prolactínico por una inducción con estrógenos, hay una continua liberación de prolactina. Si se les administra bromoergocriptina se impide la liberación de la hormona y paralelamente ocurre una disminución en la síntesis de ADN y en el peso del tumor. Para continuar con nuestros estudios sobre el mecanismo de regulación de la replicación de ADN hipofisario, utilizamos ratas tratadas con estrógenos y con un liberador de prolactina (sulpirida). Las ratas macho Wistar se dividieron en varios grupos según su tratamiento: 1) controles, 2) inyectadas con estrógenos semanalmente durante 7, 21 y 45 días, 3) tratadas semanalmente con estrógenos (igual que en el grupo anterior) más una inyección diaria de sulpirida, 4) tratadas semanalmente con estrógenos y una única inyección de sulpirida 20 h antes del sacrificio. La síntesis de ADN hipofisario se midió por la incorporación de (^{3}H) timidina en la adenohipófisis incubada in vitro. Se determinó la concentración de prolactina sérica y en la adenohipófisis por RIA. La administración de estrógenos produce un marcado aumento en la síntesis de ADN en el día 7 con respecto al control (264 %). La estimulación disminuye en el día 21 (171 %) y desaparece en el 45. El mayor aumento de la concentración de prolactina sérica e hipofisaria se observó durante los primeros 7 días. Así, la prolactinemia cambió de 31 ng/ml a 150 ng/ml y el contenido hipofisario de 6.8 μg/mg a 16.9 μg/mg de tejido. En cambio el incremento en el peso de la glándula fue máximo luego de 21 días de tratamiento (de 7.5 mg en rata control a 15.5 mg en la rata estrogenizada durante 21 días). Una única inyección de sulpirida estimuló considerablemente la liberación de prolactina (de 31 μg/ml en los controles cambió a 150 a los 7 días, 232 a los 21 días y 358 μg/ml a los 45 días). La estimulación de la síntesis de ADN fue de 385 % en el día 7, disminuye a 179 % en el día 21 y desaparece en el día 45. Las inyecciones diarias de sulpirida produjeron cambios similares en la liberación de prolactina y en la síntesis de ADN. El aumento en el tamaño de la hipófisis fue mayor en este último grupo que en el de las ratas estrogenizadas. Los resultados demuestran que hay una relación entre la liberación de prolactina, la síntesis de ADN y el crecimiento de la glándula. Además, la liberación de prolactina depende del contenido de esta hormona en la glándula. Así, el aumento en la síntesis de ADN y el crecimiento de la hipófisis, luego del estímulo con sulpirida, depende del aumento en la liberación de prolactina que se produce en respuesta a la sulpirida. En ratas tratadas con una sola dosis de sulpirida la estimulación de la replicación de ADN fue mayor que en las tratadas diariamente.

146

Acción de la histamina sobre la secreción y contenido pituitario de tirotrofina (TSH) en la rata normal y durante el ayuno

E. R. ULLOA, R. J. BOADO, A. A. ZANINOVICH

Laboratorio de Investigaciones Endocrinológicas, CONICET, Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas José de San Martín y Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires

Estudios previos de este laboratorio indican que la inhibición de los receptores H_2 con cimetidina produce un aumento en la respuesta de la TSH a la hormona liberadora de tirotrofina (TRH). El ayuno prolongado en la rata produce una depresión del eje hipófiso-tiroideo. El presente trabajo estudió la acción de la histamina, la histidina (precursor biológico de la histamina) y la cimetidina sobre la TSH plasmática (TSHp) y el contenido pituitario de TSH (cpTSH) en ratas ayunadas y en ratas con dieta normal. Se utilizaron ratas Wistar que se dividieron en dos grupos experimentales. Uno con dieta normal y agua *ad libitum* y un segundo grupo se mantuvo en ayuno por 92 h y recibió agua *ad libitum*. Ambos grupos fueron tratados con las siguientes drogas: histamina (0.35 mg/100 g de peso vía ip), histidina (50 mg/rata vía ip) y cimetidina (10 mg/100 g de peso vía ip). El grupo control recibió el vehículo de la inyección solamente. A los 120 min de inyectar cimetidina, a los 60 min de la inyección de histidina y a los 30 min post-histamina, los animales fueron sangrados por punción cardíaca y se les extrajo la hipófisis, la que fue homogeneizada con buffer PBS pH 7.6 en baño de hielo. La TSH plasmática y pituitaria se midió por RIA con los reactivos donados por el NIAMDD. Los resultados obtenidos en los animales con dieta normal fueron: Control: la TSHp fue 51 ± 7 (ES) mU/ml y el cpTSH 94 ± 10 mU/mg de proteína; histamina: TSHp 54 ± 4 mU/ml (NS vs control) y el cpTSH 116 ± 11 mU/mg de proteína (NS); histidina: TSHp 56 ± 6 mU/ml (NS) y el cpTSH 96 ± 13 mU/mg de proteína (NS); cimetidina: TSHp 50 ± 5 mU/ml (NS) y el cpTSH 176 ± 12 mU/mg de proteína ($p < 0.05$ vs control). Ratas ayunadas: control: TSHp 37 ± 3 mU/ml y cpTSH 139 ± 10 mU/mg de proteína; histamina: TSHp 24 ± 2 mU/ml ($p < 0.05$ vs control) y el cpTSH 117 ± 16 mU/mg de proteína (NS); histidina: TSHp 21 ± 2 mU/ml ($p < 0.01$ vs control) y el cpTSH 143 ± 12 mU/mg de proteína (NS); cimetidina: TSHp 26 ± 3 mU/ml (NS) y el cpTSH 148 ± 10 mU/mg de proteína (NS). En el ayuno hay una disminución en la TSHp ($p < 0.01$ vs control con dieta normal) y un aumento del cpTSH ($p < 0.01$) vs control con dieta normal), igualmente la histidina y la histamina disminuyeron aún más la TSHp sin modificar el cpTSH. En las ratas normales estas sustancias no produjeron cambios en la TSHp pero aumentaron significativamente el cpTSH con la cimetidina. Conclusión: la histamina tendría una acción inhibitoria sobre la secreción de TSH en la rata ayunada actuando posiblemente a nivel hipotalámico pues en el ayuno la hipófisis responde al estímulo con TRH (Campbell et al, *Endocrinology* 100: 580, 1977). Esta acción se pondría en evidencia en el ayuno posiblemente porque existiría una mayor sensibilidad a la histamina que se encuentra marcadamente disminuida respecto de la rata normal (Taylor et al, *J Neurochem* 19: 341, 1972).

147

Efecto de la acidosis y la diabetes experimental sobre el eje hipófiso-tiroideo en la rata

R. J. Boado, E. R. Ulloa, A. A. Zaninovich

Laboratorio de Investigaciones Endocrinológicas, CONICET, Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas José de San Martín y Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires

Trabajos recientes de este laboratorio mostraron en la rata diabética alteraciones del metabolismo periférico de la tiroxina (T4) (Zaninovich et al, *Acta Endocrinol* (Kbh) 86: 336, 1977) y de la triiodotironina (T3) (Boado et al *Acta Endocrinol* (Kbh) 89: 323, 1978). Es conocido también, que en la diabetes experimental y en el ayuno existe una disminución de los niveles séricos de la tirotrofina (THS) por un mecanismo aún no aclarado. El presente trabajo estudió el efecto de la acidosis y la diabetes experimental en este fenómeno. Se usaron ratas Wistar macho de aproximadamente 200 g de peso corporal. Se estudiaron animales hechos diabéticos con la inyección de 6.5 mg de estreptozotocina ip/100 g de peso y ratas normales tratadas con $ClNH_4$ (1.5 % en el agua de bebida/7 días), o con ácido beta-hidroxibutírico (BHB) (4 o 10 mg de BHB/100 g ip/día/3 días), además de ratas control

que recibieron el vehículo solamente. Los animales se sangraron por punción cardíaca, sus hipófisis se removieron inmediatamente y se homogeneizaron en forma individual en buffer PBS a 4° C. Se midió la concentración de TSH sérica (TSHs) y pituitaria (TSHp) (NIAMDD), al igual que los niveles séricos de T4 y T3 (T4s y T3s) por radioinmunoanálisis. En los animales diabéticos sin tratar ($n = 6$), estudiados 48 h después de la última dosis de insulina de reemplazo, versus el grupo control ($n = 6$) los resultados fueron: TSHs 76 ± 7 vs 102 ± 4 μU/ml ($p < 0.05$); TSHp 240 ± 17 vs 247 ± 16 mU/glándula ($p =$ NS); T4s 3.1 ± 0.2 vs 4.2 ± 0.2 μg/dl ($p < 0.05$); T3s 17 ± 4 vs 53 ± 8 ng/dl ($p < 0.01$); glucemia 740 ± 59 vs 116 ± 7 mg/dl ($p < 0.01$). La inyección iv de 1 ug/100 g de TRH mostró una respuesta de TSH ligeramente menor, en ratas diabéticas de 48 h, respecto del control ($p =$ NS). Cambios similares se observaron en las ratas diabéticas estudiadas 30 días después de suspender el tratamiento insulínico ($n = 5$), con excepción de la TSHp que se encontró marcadamente disminuida respecto del control ($n = 7$) (77 ± 20 vs 148 ± 14 mU/glándula, $p < 0.05$). En el grupo de animales tratados con $ClNH_4$ ($n = 6$) no se observaron variaciones significativas respecto de su control ($n = 6$). En ratas tratadas con 10 mg de BHB hubo una ligera disminución de la TSHs (71 ± 10 vs 96 ± 15 μU/ml) que no fue significativa y de la TSHp (268 ± 13 vs 351 ± 20 mU/glándula, $p =$ NS). En ratas tratadas con 4 mg de BHB no hubo cambios significativos de la TSHs y de la TSHp, respecto al grupo control. Conclusión: estos resultados muestran que la diabetes inducida por estreptozotocina produce una hipofunción hipófiso-tiroidea, mientras que el tratamiento con $ClNH_4$ o BHB no modificaron significativamente los parámetros estudiados.

148

Fosfatasa ácida en cáncer de mama

J. Filmus, O. Podhajcer, J. Mordoh, R. Chacón, R. Estévez, E. Roca, N. Guman, E. Maresso

Fundación CIMAE, Universidad del Salvador y Policlínico M. R. Castex, San Martín

Recientes trabajos han informado acerca del aumento de los niveles séricos de la fosfatasa ácida (FA) en pacientes con cáncer de mama con metástasis óseas. Por otro lado se ha constatado que ciertas metástasis en médula ósea del cáncer mamario presentan reacción cruzada con suero anti-isoenzima 2 de FA (más conocida como fosfatasa ácida prostática, FAP). El objetivo de este trabajo es averiguar el origen de la FA elevada en el suero de los pacientes con cáncer de mama con metástasis óseas y establecer qué isoenzima es la responsable de la reacción cruzada descripta. Para ello se estudia el perfil isoenzimático del tejido tumoral mamario así como la reacción de las isoenzimas presentes en él con la anti-FAP. Se utilizaron tejidos mamarios con carcinoma, con patología benigna y normales obtenidos quirúrgicamente. Para determinar el perfil isoenzimático se prepararon homogenatos pulverizándolos en nitrógeno líquido utilizando luego un Polytron. Se centrifugó a $28\,000 \times g$ 20 min y se tomó el sobrenadante. El perfil isoenzimático se obtuvo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 %. La separación de las isoenzimas de los tejidos mamarios se efectuó mediante la corrida sucesiva en columnas de Sephadex G-200 y DEAE-Sephadex. La reacción de dichas isoenzimas con la anti-FAP se evaluó mediante contrainmunoelectroforesis utilizando un antisuero preparado contra FAP purificada. Para el dosaje de la isoenzima 5 de la FA, que es resistente al tartrato 0.02 M, y de la fosfatasa alcalina se utilizaron sueros de pacientes con cáncer primario o metastásico así como sueros normales de voluntarios. Los perfiles electroforéticos revelaron que tanto el carcinoma mamario, como la patología benigna y el tejido normal presentaron las mismas isoenzimas, las que de acuerdo con su electromovilidad se identificaron como isoenzima 3 e isoenzima 4 siendo la 3 la de mayor actividad. No se encontró isoenzima 5. Al separar mediante las columnas a las isoenzimas 3 y 4 y al estudiar la reacción de las mismas con la anti-FAP, se observó que sólo la 4 presentaba reacción cruzada manteniendo su actividad catalítica. Al analizar los sueros de pacientes con metástasis óseas

se observó que la isoenzima predominante es la 5. Dado que no hemos hallado dicha isoenzima en el tumor primario parece probable que el origen de la fosfatasa ácida aumentada en los pacientes sea óseo. En función de ello se decidió analizar si el dosaje de la isoenzima 5 de la FA es un indicador confiable de la presencia de metástasis óseas comparando sus niveles con los de la fosfatasa alcalina. Al hacerlo se vio que en el 81 % de 26 pacientes de cáncer con metástasis óseas los niveles de dicha isoenzima estaban por encima de lo normal mientras que sólo el 61 % mostró elevación de fosfatasa alcalina. De los 21 pacientes con cáncer mamario sin metástasis óseas evaluados ninguno presentó niveles de FA por encima de los valores normales mientras que el 9.5 % mostró fosfatasa alcalina elevada. En conclusión, la presencia de isoenzima 4 en cantidades detectables en ciertos tumores mamarios sería la responsable de la reacción positiva de dichos tumores frente al anti-FAP. El dosaje de la isoenzima 5 de la FA parece ser un buen indicador de la presencia de metástasis óseas. Su dosaje puede completar al ya tradicional de la fosfatasa alcalina.

149

Características de la inhibición producida por la alcalosis metabólica sobre la secreción de insulina

O. R. Rebolledo, Ana María Gutiérrez, J. J. Gagliardino

CENEXA, Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Previamente hemos demostrado que la alcalosis extracelular (pH 7.8), debida a un aumento del bicarbonato, produce una significativa inhibición de la secreción de insulina comparada con la obtenida a pH 7.4. Utilizando el modelo de páncreas de rata aislado y perfundido, estimulado con glucosa 16.7 mM entre los minutos 0 y 30, en el presente trabajo hemos estudiado: *a)* el efecto dosis-respuesta de los cambios de pH extracelular sobre la secreción de insulina; *b*) el efecto de al alcalosis gaseosa sobre la secreción de insulina; *c)* la reversibilidad de esa inhibición. *a)* Incrementos graduales del contenido de Na CO_3H^-, capaces de producir cambios de 0.1 de pH en el rango de 7.4 a 7.8, produjeron una inhibición de la secreción correlativa al grado de alcalosis:

		7.4		
1ª fase (1 - 6 min)	μU/min	175 ± 31		
2ª fase (7 - 30 min)		210 ± 32		
7.5	7.6	7.7	7.8	
135 ± 35	87 ± 25	78 ± 4	35 ± 19	
208 ± 39	108 ± 28	66 ± 16	18 ± 4	

Con los datos experimentales se trazaron las curvas pH: secreción de insulina para ambas fases y se calcularon las ecuaciones que las definen, obteniéndose regresiones polinómicas de grado 3 (r = 0.71 y 0.82, respectivamente), que permiten describir el comportamiento del sistema. *b)* Cuando el pH extracelular se llevó a 7.8 disminuyendo la pCO_2, la secreción se inhibió en forma similar a la encontrada con la alcalosis consecutiva a aumento del bicarbonato. *c)* Para estudiar la reversibilidad del efecto inhibitorio del aumento de pH extracelular sobre la secreción de insulina, se emplearon dos sistemas. El primero consistió en la perfusión del preparado a pH 7.4, 7.8 y 7.4 en forma sucesiva, y el segundo fue el agregado de teofilina (10 mM) al páncreas perfundido a pH 7.8 en forma permanente. En el primer caso se comprobó que tanto la instalación como la desaparición de la inhibición fueron inmediatas. Además, la secreción de insulina obtenida durante el 2º ciclo de pH 7.4, comparado con el primero, fue significativamente mayor, mostrándose así el efecto potenciador de estímulos de glucosa secuenciales sobre dicha secreción. El agregado de teofilina mostró igualmente un inmediato y significativo aumento de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa. En conclusión, la secreción de insulina es inhibida por la alcalosis extracelular en forma proporcional a la magnitud del cambio de pH alcanzado, pudiendo ser definida por una función polinómica. Esta inhibición no depende de la concentración de bicarbonato, es reversible, y su instalación al igual que su remoción siguen inmediatamente a los cambios de pH.

150

Acción de las hormonas tiroideas sobre la función endócrina del páncreas

Ana María Cortizo, G. D. Chazenbalk, M. A. Pisarev, C. L. Gómez Dumm, J. J. Gagliardino

CENEXA, Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET), División Bioquímica Nuclear CNEA y Cátedra de Embriología, Biología e Histología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

El objetivo del presente trabajo es el estudio del mecanismo de acción de las hormonas tiroideas sobre la secreción de insulina. Se emplearon ratas normales e hipotiroideas (inyección ip de ^{131}I 700 μCi/rata). Los animales inyectados mostraron un marcado retardo de crecimiento respecto de los controles al igual que un descenso significativo de los valores de T3 (60.3 ± 4.3 vs 27.5 ± 2.9 ng %) y T4 (2.5 ± 0.1 vs 0.7 ± 0.1 ng %). La secreción de insulina de islotes aislados (colagenasa) provenientes de animales hipotiroideos, en presencia de glucosa 16.6 mM, fue significativamente menor que la obtenida en los controles normales (76.7 ± 14.8 vs 41.5 ± 11.7 μU/islote/hora). La producción de $^{14}CO_2$ por los islotes a partir de glucosa (U) $-^{14}C$ fue significativamente menor en los provenientes de animales hipotiroideos (24.5 ± 1.4 vs 16.9 ± 0.7 pmoles/islote/120 min). Igualmente, la captación de $^{45}Ca^{++}$ por estos islotes fue significativamente menor en los hipotiroideos (4.09 ± 0.19 vs 2.98 ± 0.17 pmoles/islote/hora). A la microscopía electrónica, las células B de los islotes de animales hipotiroideos mostraron una intensa vacuolización del citoplasma consecutiva a la dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico y un aumento del halo claro que separa el material de secreción de la membrana envolvente de los gránulos. A fin de evaluar la posible acción directa de las hormonas tiroideas sobre el páncreas endocrino, se determinó la producción de ioduros, T3 y T3r a partir de T4 $- ^{125}I$ incubada con islotes aislados en presencia de distintas concentraciones de glucosa. Se vio que la deshalogenación de T4 por los islotes es mayor a 16.6 mM que a 3.3 mM de glucosa: T3 5.8 ± 0.4 vs 3.8 ± 0.1, T3r 4.8 ± 0.9 vs 2.5 ± 0.1; ioduros 12.2 ± 0.9 vs 7.1 ± 0.2. Igualmente dicha deshalogenación mostró una clara dependencia temporal, con desvío de la producción de T3 y T3r a ioduros. Conclusiones: el descenso de los niveles circulantes de T3 y T4 se acompaña de una disminución de la secreción de insulina por los islotes de Langerhans en respuesta a la glucosa. Esta disminución es debida, al menos en parte, a una menor capacidad de las células B para metabolizar glucosa y captar calcio. El hipotiroidismo igualmente induce cambios ultraestructurales en las células B pancreáticas. La capacidad de deshalogenar T4 demostrada por los islotes de Langerhans en función del tiempo y la concentración de glucosa, hablan en favor de un posible efecto directo de las hormonas tiroideas sobre la función de los mismos.

151

Efecto de la ingestión crónica de dietas enriquecidas en bicarbonato sobre el tejido óseo de ratas intactas y tiroparatiroprivas

J. C. Ballina, R. J. Di Masso, A. E. Lucena, R. C. T. Puche

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

Como la administración de alcalinos provocaría, por una parte, estímulo en la secreción de hormona paratiroidea (por disminución del Ca iónico plasmático) y por otra, deposición de fosfato de calcio en el esqueleto (por neutralización local de protones), se estudió la interacción entre la función paratiroidea y la dieta alcalina. Se utilizaron ratas adultas intactas y paratiroprivas de 180-220 g de peso, alojadas en jaulas metabólicas y alimentadas con una dieta compuesta por: caseína, harina integral de trigo y sales (12 : 85 : 3). Los animales tratados recibieron la misma dieta en la que el cloruro de sodio fue reemplazado por una mezcla de bicarbonato y cloruro de sodio con el objeto de provocar una sobrecarga alcalina sin modificar la oferta osmótica renal. El metabolismo cálcico se analizó por el modelo de Milhaud-Aubert. Con la sobrecarga alcalina utilizada los animales intactos mostraron un au-

mento significativo en la absorción verdadera de calcio (controles: 27.2 ± 4.9 mg Ca/día/100 de peso corporal; Tratados: 40.9 ± 3.5; $p < 0.01$) compensado por el incremento en la excreción de Ca fecal endógeno (Controles: 3.4 ± 0.4 mg Ca/día/100 g de peso; Tratados: 14.1 ± 6.2; $p < 0.01$). En los animales tiroparatiroprivos el mismo tratamiento no modificó los parámetros anteriores: Absorción verdadera (Controles: 41.2 ± 22.5; Tratados: 44.2 ± 14.4; $p < 0.05$), y Ca fecal endógeno (Controles: 4.09 ± 3.4; Tratados: 6.9 ± 6.8; $p < 0.05$). En ambos grupos experimentales (intactos y tiroparatiroprivos) el tratamiento no produjo cambios significativos en la tasa de deposición ósea de Ca (Intactos Controles: 38.2 ± 3.8 mg Ca/día/100 g de peso; Intactos Tratados: 34.0 ± 3.8; $p < 0.05$) (Tiroparatiroprivos Controles: 10.4 ± 5.0; Tiroparatiroprivos Tratados: 10.9 ± 5.8; $p < 0.05$) y deprimió la tasa de reabsorción ósea (Intactos Controles: 14.5 ± 6.3 mg Ca/día/100 g peso; Intactos Tratados: 7.3 ± 3.8) (Tiroparatiroprivos Controles: 5.0 ± 1.1; Tiroparatiroprivos Tratados: 1.08 ± 1.0), lo que condujo a un aumento en la masa cálcica del esqueleto que fue significativo sólo en los animales tiroparatiroprivos. El examen histológico de la metáfisis femoral distal revela que los animales intactos tratados tienen un ligero aumento de la masa ósea (Controles: 34.3 ± 0.85 tejido óseo % de hueso anatómico; Tratados: 38.7 ± 0.9) y una significativa reducción en el % de superficie ósea en reabsorción (Controles: 8.0 ± 0.7; Tratados: 2.3 ± 0.38). Estos resultados indicarían que la sobrecarga de bicarbonato actúa independientemente de la presencia de paratohormona y directamente sobre el proceso de reabsorción ósea.

152

Metabolismo del calcio en ratas con diabetes inducida por aloxano

Martha E. Locatto, María del C. Fernández, Digna Caferra, Ana Masoni, Rodolfo Puche

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del déficit de insulina sobre el metabolismo del calcio en ratas con diabetes inducida por aloxano. Las experiencias se realizaron sobre ratas de 200 g de peso promedio. Los animales tratados recibieron una única dosis de 20 mg de aloxano por 100 g de peso, por vía intraperitoneal. Se seleccionaron para el estudio los animales tratados que presentaron a las 48 h valores de glucosa plasmática superiores a 2 g %. Los animales fueron alimentados con una dieta semisintética con contenido normal de calcio y fósforo, (Ca: 0.78 g %; P: 0.74 g %). Se realizaron controles diarios de ingesta de agua, comida, diuresis, glicemia y glucosuria. El metabolismo del calcio se estudió según la técnica de Milhaud Aubert con el auxilio de ^{45}Ca. Las ratas aloxanizadas presentaron aumentos significativos en la excreción de calcio fecal endógeno, (C: 7.17 ± 0.42 mg %, T: 12.93 ± 1.60 mg %, $p < 0.05$) y calcio urinario, (C: 0.29 ± 0.01 mg %, T: 4.87 ± 1.47 mg %, $p < 0.05$). No obstante ello, la mayor disponibilidad de calcio a nivel intestinal, resultó de la polifagia, duplicó la absorción verdadera de calcio, (C: 23.07 ± 4.58 mg %, T: 39.78 ± 4.80 mg %, $p < 0.05$), lo que condicionó balances superiores, (C: 17.11 ± 3.34, T: 33.09 ± 4.89, $p < 0.01$). El aumento en el balance se reflejó en ligero aumento en el contenido de calcio del esqueleto, sin significado estadístico, atribuible a la corta duración del experimento. Los animales tratados no mostraron la correlación entre deposición y reabsorción ósea de calcio que se observa en los normales. El tratamiento no perturbó el efecto de la paratohormona sobre la reabsorción ósea, que siguió siendo función del balance de calcio. El análisis de la covariancia demostró que tanto tratados como controles reducen la tasa de reabsorción con el aumento del balance. Para un balance común las tratadas muestran una disminución de la tasa de reabsorción de 18.37 mg de calcio por g de calcio del esqueleto, (F_a: 16.46, $p < 0.001$). La deposición de calcio en el hueso, (v_{o+}), disminuyó en función inversa con los valores de glucosa plasmática, ($r = 0.98$, $p < 0.001$). Es probable que el aumento del calcio fecal endógeno sea consecuencia de la depresión en la tasa de deposición. No obstante que el hueso respon-

de a la paratohormona endógena, el déficit de insulina deprime la actividad remodeladora del tejido óseo y perturba el acoplamiento entre la deposición y la reabsorción.

153

Estudio secuencial del desarrollo y biología ósea del pollo raquítico tratado con vitamina D_3, 25 (OH) D_3 y 1.25 $(OH)_2D_3$

Ana M. Masoni, D. A. Alloatti, E. Roveri, Ana M. Smacchia, R. Puche

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

Este estudio comparativo de la vitamina D_3 y sus metabolitos ha sido llevado a cabo con el objeto de analizar simultáneamente el efecto de los esteroides mencionados sobre el desarrollo y la biología ósea. El modelo experimental empleado ha sido el del pollo raquítico alimentado con una dieta *ad hoc* desde su nacimiento hasta los 35 días de edad. Los animales recibieron los esteroides por vía oral, día por medio, siendo el rango de dosis totales empleadas de 0.05 μm a 10.0 μm (n : 160 pollos). Las curvas de incremento de peso en función del suplemento recibido indican que el mejor desarrollo se obtiene con la vitamina D_3, los animales tratados con 1.25 $(OH)_2$ D_3 no difieren significativamente de los animales raquíticos y el 25 (OH) D_3 tiene una eficacia intermedia. Con la dosis total de 2 μm el incremento de peso (diferencia entre peso final y peso inicial) es de 82.0 $\pm$ 6.1 g para el 1.25 $(OH)_2D_3$; 120.0 $\pm$ 4.5 g para el 25 (OH) D_3; 140 $\pm$ 8.4 g para la D_3 y 75.0 $\pm$ 2.0 g para los raquíticos. El peso seco, el contenido total de calcio, fósforo e hidroxiprolina del fémur muestran igualmente que los animales tratados con 1.25 $(OH)_2D_3$ tienen un crecimiento que no discrepa de los raquíticos y significativamente diferente del 25 (OH) D_3. Los animales raquíticos tienen un aumento de la masa ósea (% de tejido óseo respecto del volumen de hueso anatómico) con respecto a los normales (masa ósea total de raquíticos: 29.1 $\pm$ 2.4; masa ósea total de los normales: 22.4 $\pm$ 0.31), esta diferencia se debe principalmente a la masa de tejido osteoide (raquíticos: 15.2 $\pm$ 2.0, normales: 4.0 $\pm$ 0.8). Los animales tratados con vitamina D_3 y el 25 (OH) D_3 presentan una imagen histológica y una evolución a lo largo del tiempo semejante a los normales, en cambio los animales tratados con 1.25 $(OH)_2D_3$ presentan una imagen histológica de hueso maduro que ha sufrido el impacto del defecto de desarrollo (14.5 $\pm$ 1.2 de masa ósea total y 1.16 $\pm$ 0.2 de masa osteoide), a pesar de mostrar calcemias (2.50 $\pm$ 0.07 mM), fosfatemias (1.3 $\pm$ 0.1 mM), magnesemias (0.78 $\pm$ 0.02 mM) y fosfatasemias (354.0 $\pm$ 17.1 UKA/ml) normales. Puesto que la vitamina D_3 es metabolizable a 25 (OH) D_3 y 1.25 $(OH)_2D_3$ estos resultados parecen indicar que la acción conjunta de los tres esteroides en proporciones fisiológicas sería la responsable de armonizar el desarrollo corporal con el óseo.

154

Influencia del genotipo sobre la susceptibilidad del tejido óseo al tratamiento con estradiol

Lucila I. Hinrichsen, Adriana Dusso, D. Berli, R. Puche

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

El interés en el efecto de los estrógenos sobre el tejido óseo y el metabolismo fosfocálcico proviene de su probable participación en la etiología de la osteoporosis postmenopáusica. Los resultados publicados indican que la respuesta a los estrógenos dependería de la especie empleada, de las diferencias genéticas dentro de especie y de la edad en el momento del tratamiento. En un intento de conciliar resultados contradictorios, se estudió el efecto del estradiol sobre el tejido óseo y el metabolismo fosfocálcico en dos cepas endocriadas de ratas (*e* y *m*), en dos etapas del desarrollo (30 y 60 días de edad), con una serie de técnicas diseñadas para proveer simultáneamente datos histológicos (morfométricos cuantitativos), químicos y metabólicos. Se utilizaron animales de ambos sexos, que se alojaron en jaulas meta-

bólicas individuales durante 18 días; en ese lapso recibieron diariamente 43.2 μg de estradiol por cada 100 g de peso corporal, por vía subcutánea. A los 48 días de edad, el estradiol exógeno modificó la histología del hueso metafisario en ambas líneas. Aumentó el volumen óseo (Testigos *m* : 32, Estrogenizados *m* : 45.5; T *e* : 29, E *e* : 37.4; $p < 0.01$) y el porcentaje de superficie ósea en formación (T *m* : 73, E *m* : 85.2; T *e* : 61.6, E *e* : 73; $p < 0.025$), y disminuyó la superficie ósea en reabsorción (T *m* : 12.2, E *m* : 4.8; T *e* : 11.4, E *e* : 6.4; $p < 0.001$). En línea *m* se observó también una disminución del espesor de la placa de crecimiento (T : 83 μm, E : 60 μm, $p < 0.01$). A los 78 días de edad las modificaciones histológicas se produjeron sólo en línea *m* ($p < 0.01$), sin que estuvieran acompañadas por un aumento del volumen óseo. Las modificaciones metabólicas y químicas insinuadas en *m* a los 48 días de edad (etapa de crecimiento activo), fueron significativas en las ratas adultas. Disminuyó la tasa de crecimiento (T : 2.5 g/día, E : – 0.2 g/día, $p < 0.01$). Se observó una disminución en la tasa de deposición de Ca (T : 142 mg/día, E : 92, $p < 0.01$) y en la tasa de reabsorción (T : 114 mg/día, E : 61, $p < 0.025$). También se produjo una disminución del pool de intercambio rápido de Ca (T : 22.3 mg, E : 14.4, $p < 0.001$). La administración de estradiol no afectó a las ratas *e* adultas en ninguno de los aspectos estudiados. La administración de estradiol a ratas de dos líneas endocriadas ha permitido mostrar que los principales efectos del estrógeno exógeno en el esqueleto: inhibición del crecimiento con aceleración del cierre epifisario, aumento del volumen óseo metafisario y aumento de la deposición de Ca son fenómenos independientes, fuertemente influidos por el genotipo.

155

Cultivo de células vaginales. Un modelo para el estudio del efecto biológico de hormonas ováricas

C. J. Conti, Irma B. Giménez, C. M. Aldaz, Débora R. Tasat

Departamento de Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires

Con el fin de buscar un modelo in vitro que permita el estudio a nivel celular de la compleja interrelación de las hormonas ováricas y su órgano *target*, se desarrolló un cultivo de células del epitelio vaginal de rata Wistar. La vagina de los roedores que se caracteriza por los drásticos cambios proliferativos y diferenciativos de su epitelio en respuesta a cambios hormonales, se presenta como un modelo interesante para aclarar algunas de las controversias sobre la acción in vitro de hormonas ováricas. Vaginas de rata Wistar fueron tripsinadas y células epiteliales con mínima o ninguna contaminación fibroblástica fueron cultivadas en Medio HAM F-12 con la adición de insulina, hidrocortisona y cholera toxina, formando colonias epiteloides. Estas células mostraron ser solo parcialmente dependientes del suero fetal ya que ha podido cultivar y desarrollar en medio químicamente definido aunque con baja eficiencia. Muy importante mostró ser el estado hormonal de la rata en el momento del cultivo, ya que se consigue máxima eficiencia de cultivo en el período proestro-diestro, siendo mínimo en metaestro. El origen epitelial de los cultivos fue demostrado mediante técnicas inmunohistoquímicas con un anticuerpo anti-prequeratina desarrollado en nuestro laboratorio. Estos cultivos se caracterizan por diferenciarse in vitro en forma equivalente a los epitelios malpighianos, es decir la formación de esqueletos de citoqueratina y envoltura córnea. Células diferenciadas pueden ser determinadas en estos cultivos mediante técnicas inmunohistoquímicas o por la resistencia de la queratina y las envolturas córneas a soluciones de 8 M urea y 8 M urea con 0.1 M de 2-mercaptoetanol. Un porcentaje de células es permanentemente desprendido de la colonia. El estudio de estas células, muestran en el 100 % de ellas signos de diferenciación. El suero fetal y la cholera toxina parece regular este fenómeno. La posibilidad de regular proliferación y diferenciación en estos cultivos lo presenta como un modelo adecuado para el estudio de la interrelación hormona-célula *target*, en especial por la posibilidad de realizar los cultivos en medios químicamente definidos.

156

Estudio inmunoquímico de los distintos tipos de anticuerpos antiespermáticos del moco cervical y del plasma seminal de parejas estériles

ALICIA B. MAZZOLLI, NILDA ELIOSOFF

Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Durante el estudio inmunológico de parejas estériles se han podido detectar anticuerpos antiespermáticos inmovilizantes, aglutinantes o citofílicos, en el moco cervical (MC) y en el plasma seminal (PS) de las mismas. Sin embargo, esta metodología clásica no nos indica si lo que medimos con las diferentes técnicas, son un mismo anticuerpo con distintas actividades o si se trata de anticuerpos dirigidos a diferentes epitopes del complejo antigénico, que es el espermatozoide. En esta primera parte del estudio, se trató de relacionar las distintas actividades con el aumento, ausencia o aparición de las distintas inmunoglobulinas. Para ello se prepararon pools de moco cervical obtenidos durante el pico ovulatorio, libre de antígeno espermático desde el comienzo del ciclo, y plasma seminal, ambos provenientes de parejas fértiles y estériles. Conejos de 2 kg de peso fueron sensibilizados repetidamente en forma bisemanal, hasta conseguir sueros con alto título para uno y otro pool inyectado, agregando Adyuvante Completo de Freund en forma alternada. Por otro lado, se utilizaron inmunoglobulinas purificadas (Cappel Lab.), las cuales fueron usadas como referencia. Mocos cervicales fueron seleccionados sin tener en cuenta antecedente alguno, en función de: 1) alto título de anticuerpos aglutinantes; 2) alto título de inmovilizantes; 3) alto título de anticuerpos citofílicos. Los plasmas seminales fueron seleccionados de la misma manera. Para corroborar resultados con anticuerpos citofílicos y valiéndonos de la propiedad de estos anticuerpos de adherirse a los receptores macrofágicos a 37° C y despegarse o eluírse de la superficie celular a 56° C, purificamos la actividad citofílica partiendo de moco cervical y de plasma seminal con alto título de los citados anticuerpos. El eluído así obtenido fue analizado, una vez concentrado, como las muestras anteriores. Los resultados obtenidos nos mostraron: 1) El PS normal posee IgG, IgA 7 S e IgM, siendo IgG la de mayor concentración. 2) PS con alto título de anticuerpos inmovilizantes mostró un marcado aumento de IgM. 3) PS aglutinante no mostró diferencias con el control. 4) PS con alto título de anticuerpos citofílicos mostró la aparición de IgA 11 S y aumento de IgM. 5) PS proveniente de vasectomizados, mostraron los mismos resultados que el grupo anterior. Los resultados obtenidos con moco cervical fueron: 1) El MC normal posee todas las inmunoglobulinas. 2) MC con alto título de aglutininas mostró aumento de IgA 11 S. 3) MC inmovilizante mostró aumento de IgA 11 S e IgM. 4) MC con alto título de AC dio aumento de IgA 11 S.

157

Primeros resultados del estudio inmunológico de parejas estériles

CLYDES BARRERA, N. LIPOVETZKY, NILDA ELIOSOFF, ANA MARÍA ANDREETTA, ALICIA B. MAZZOLLI

Centro de Investigaciones sobre Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Se estudiaron 65 parejas con esterilidad superior a dos años, en las que se descartaron factores endocrinos, malformaciones, etc. Como controles se estudiaron 15 parejas fértiles sin antecedente alguno. A las esposas se les extrajo suero, leucocitos circulantes y moco cervical obtenido en el pico ovulatorio, libre de antígeno espermático desde el comienzo del ciclo. A los maridos se les estudió suero, leucocitos circulantes y semen, de donde se obtuvo plasma seminal y espermatozoides. Estos últimos se utilizaron como antígenos. Inmunidad celular se testificó mediante el test directo de inhibición de migración de leucocitos (IML) y el test indirecto de inhibición de migración de macrófagos (IMM). Los antígenos fueron espermatozoides del marido y de un dador normal. La inmunidad humoral se testó mediante las siguientes técnicas: 1) test aglutinante de Rumke (TA),

2) test inmovilizante de Isojima (TI), 3) test para anticuerpos citofílicos (Mazzolli, Barrera) (TC), en los sueros de ambos, el moco cervical y el plasma seminal. Las parejas se dividieron en 3 grandes grupos: 1) factor femenino, donde la esposa presentaba antecedentes de: *a)* abortos habituales, *b)* moco hostil, *c)* infecciones genitales y sus maridos eran normospérmicos; 2) factor masculino, donde el esposo refería: *a)* varicocele, *b)* orquiepididimitis, *c)* criptorquídea; y por último el grupo 3) mixto, donde ambos miembros presentaron antecedentes. Los resultados mostraron que en el grupo control el test de IML fue de 27 ± 8 % frente al antígeno autólogo y de 32 ± 5 % para el antígeno homólogo. Se consideraron positivas inhibiciones superiores al 51 %. El TA y TI en controles nunca fueron positivos en diluciones superiores a 1/16 en suero y 1/8 en plasma seminal y moco cervical. Por ello, se consideraron positivos títulos superiores a 1/32 en suero y 1/16 en moco y plasma seminal. El test de AC mostró valores por debajo del índice 2 para los controles, por lo que más de 2 se consideró positivo. Para obtener este índice se contó el número de macrófagos con espermatozoides adheridos por 1000 macrófagos contados y se aplicó la fórmula: Valor hallado - Valor normal/Valor normal. Los resultados obtenidos en pacientes pueden resumirse en: Inmunidad celular positiva en el grupo 1, *a*) en el 63 % de los casos (n : 13) y en el 1, *b*) en 50 % (n : 14). En hombres en el 2, *b*) 55 % (n : 19) y en criptorquídeas (n : 3). TA positivo en MC en 1, *a*) el 50 % y TI positivo en el grupo 1, *b*) en 57 % de los casos (n : 14). AC positivos en suero en el grupo 2, *b)* en 64 % de los casos (n : 11). Los resultados nos muestran que la posibilidad de cada técnica no se correlaciona siempre con la positividad de la otra, por lo que medimos reactividades diferentes. Es llamativo también, la disparidad de títulos en suero y localmente (moco cervical y plasma seminal), lo que enfatiza el concepto del importante papel de la inmunidad local en estas patologías.

158

Comparación de estímulos sobre la liberación de hormona de crecimiento

María Cristina Bazán, H. Domené, J. J. Heinrich, Marta Barontini

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños, Buenos Aires

En un trabajo previo se demostró que bromoergocriptina (BE), indujo incrementos significativos en la secreción de hormona de crecimiento (HGH) en niños. El presente trabajo se realizó con el objeto de estudiar comparativamente diversos estímulos de liberación de HGH en forma aislada o asociada a estímulos dopaminérgicos o bloqueantes β adrenérgicos. Se estudiaron 68 niños (4 a 17 años) con diagnóstico de retardo de crecimiento constitucional. Con estímulo de insulina se estudiaron 30 niños. Luego de obtener una muestra basal se les administró insulina 0.05 U/kg de peso ev. Se tomaron muestras a los 20, 30, 60 y 90 min. Veintinueve realizaron hipoglucemia del $\leq$ 50 %. De ellos 11 no modificaron sus niveles de HGH y 18 respondieron con una máxima respuesta de HGH de $\bar{x}$ 15.1 ± 2.0 ng/ml. A estos 30 niños se les administró a continuación L-Dopa vo, 125 mg a menos de 15 kg, 250 mg de 15 a 30 kg y 500 mg a más de 30 kg. Posteriormente se tomaron muestras hasta los 90 min. Respondieron 16 con máxima respuesta de $\bar{x}$ 17.6 ± 2.3 ng/ml, 9 de ellos habían respondido previamente a hipoglucemia insulínica. Catorce no respondieron, 9 de ellos habían respondido previamente a hipoglucemia insulínica. Para observar si la respuesta de HGH a la hipoglucemia insulínica era modificada con la administración previa de BE se estudiaron 8 niños. Luego de extraerles un basal se les administró 0.62 mg de BE vo y se tomaron muestras a los 60 y 90 min, momento en que se inyectó 0.05 U/kg de insulina ev. Posteriormente se continuaron tomando muestras hasta los 180 min. Siete incrementaron sus niveles de HGH, con una máxima respuesta de $\bar{x}$ 22 ± 6.3 ng/ml. Seis de los mismos descendieron sus glucemias a $\leq$ del 50 % del basal, 5 de ellos tuvieron por la combinación de los dos estímulos incrementos en HGH con

una máxima respuesta de $\bar{x}$ 27 ± 8 ng/ml. Los otros dos niños del grupo no descendieron sus glucemias, pero incrementaron sus niveles de HGH por efecto de BE. Con ejercicio se evaluaron 15 niños, a los que luego de extraerles el basal se les hizo realizar ejercicio durante 20 min y posteriormente se extrajo otra muestra de sangre, 10 respondieron con una máxima respuesta de $\bar{x}$ 16.3 ± 4.4 ng/ml. Con propranolol-ejercicio se estudiaron 15 niños, a los que luego de extraerles la muestra basal se les administró vo propranolol 20 mg a niños de 25 kg y 40 mg a niños con peso mayor de 25 kg. Luego se tomaron muestras a los 90 y 120 min, momento en que realizaron el ejercicio 20 min y posteriormente se extrajo la muestra final. Todos los pacientes respondieron, la máxima respuesta fue $\bar{x}$ 31.7 ± 5.8 ng/ml. Con BE-ejercicio se estudiaron 4 niños, luego del basal se administró 0.62 mg de BE vo. Se tomaron muestras a los 60 y 90 min, en que realizaron 20 min de ejercicio, luego se hicieron extracciones a los 120 y 150 min. Todos respondieron con máxima respuesta de $\bar{x}$ 29.7 ± 12.7 ng/ml. Dada la magnitud de las respuestas y la ausencia de falsos negativos propranolol-ejercicio parece ser un buen test para evaluar liberación de HGH en niños. También con BE-ejercicio se obtuvieron muy buenas respuestas, similares a propranolol-ejercicio, pero como sólo se estudiaron 4 pacientes no se puede ser concluyente al respecto.

159

Efectos de la administración de propionato de testosterona sobre el desarrollo testicular de ratas inmaduras

ISABEL ALMIRÓN, H. E. CHEMES

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños, Buenos Aires

La administración temprana y prolongada de propionato de testosterona (PT) a ratas macho inmaduras induce a una severa atrofia testicular, que sería producida por la depresión de los niveles de gonadotrofinas (particularmente FSH) que ella induce, o bien por acción directa de dicha hormona sobre el testículo. Tratamos de establecer en qué rango de edades de las ratas macho inmaduras puede inducirse dicha atrofia testicular, y cómo son afectados algunos parámetros de madurez gonadal. Se tomaron 7 grupos de ratas macho Sherman recién nacidos, uno de los cuales no fue tratado (C1), otro fue inyectado desde el día del nacimiento hasta el día 35 de vida con 0.1 ml de aceite de girasol (C 2) y los restantes fueron inyectados desde el día del nacimeinto (d0), día 5 (d5), día 10 (d10), día 15 (d15) y día 20 (d20) hasta el día 35 de vida con 2 mg de PT en 0.1 ml de aceite de girasol. Los resultados se expresan como medias y los límites de sus coeficientes de variación (CV). Los pesos testiculares relativos (mg/g de peso corporal) fueron: C1 4.57, C2 3.94, d0 0.69, d5 1.13, d10 1.87, d15 2.88, d20 4.12 (CV 3-22 %). Se determinaron los pesos de la próstata (mg): C1 49, C2 55, d0 138, d5 125, d10 139, d15 179, d20 200 (CV 9-19 %) y de las vesículas seminales (mg): C1 36, C2 32, d0 500, d5 411, d10 372, d15 377, d20 485 (CV 5-26 %). El diámetro de los túbulos seminíferos en cada grupo fue (μm): C1 207, CC2 206, d0 118, d5 132, d10 141, d15 177, d20 206 (CV: 1 %). Se valoró semicuantitativamente la madurez alcanzada por la espermatogénesis. Los únicos grupos en los cuales se observaron túbulos muy inmaduros con ausencia de estadíos meióticos fueron d0 (3 %) y d5 (4 %), mientras que en C1, C2, d10, d15 y d20 todos los túbulos poseían algún grado de desarrollo meiótico. Se valoró la finalización de la meiosis por el porcentaje de túbulos con presencia de células postmeióticas (espermátides): C1 66 %, C2 78 %, d0 9 %, d5 9 %, d10 62 %, d15 79 %, d20 99 %. En d0 el 80-90 % de los túbulos mostraron células en degeneración. El porcentaje disminuyó al 40-50 % de los túbulos en d5 y d10, mientras que C1, C2, d15 y d20 mostraron células en degeneración en sólo 10-20 % de los túbulos. Los datos de peso testicular, diámetro tubular y madurez alcanzada por los túbulos seminíferos en los distintos grupos muestran que el daño testicular producido por la administración de PT es más importante cuanto más precozmente se inicia el tratamiento, siendo dramático en los grupos

tratados desde el nacimiento y desde el día 5 de vida, y no observándose ninguna inhibición del desarrollo testicular en los animales inyectados desde los 20 días. La próstata y las vesículas seminales muestran una estimulación afectiva en todos los grupos tratados. Evidencias previas han demostrado que las dosis de PT administradas mantienen concentraciones intratesticulares de testosterona suficientes como para estimular la espermatogénesis en animales mayores de 20 días. Los resultados aquí presentados demuestran que las etapas tempranas de la primera onda espermatogénica no pueden ser mantenidas por la administración exclusiva de testosterona y sugieren que el requerimiento no satisfecho para una maduración testicular normal sería el de gonadotrofinas, probablemente de FSH.

160

Influencia que la ingesta de dietas desequilibradas en aminoácidos ejerce sobre la eritropoyesis de la rata en crecimiento

María Ester Barrio Rendo, María Esther Río

Departamento de Bromatología y Nutrición Experimental, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Hemos estudiado de qué manera la ingesta de una dieta desequilibrada, entendiéndose por tal aquella que tiene alterada la relación entre aminoácidos esenciales con respecto al limitante, influye sobre la magnitud de eritropoyesis en la rata en crecimiento. Utilizamos crías de ratas que provienen de madres que hayan tenido por lo menos 12 o más crías y que el destete en el día 25 tienen peso 25 % por debajo del teórico. A estos animales los llamamos subnutridos y son los que alimentamos durante 10 días con las diferentes dietas experimentales. B: dieta basal. Como proteína tiene yema de huevo desengrasado en baja concentración (4 %). D: Dieta desequilibrada. Como proteínas tiene yema y gluten de trigo, su limitante es la lisina. Concentración proteica 18 %. C: Yema desengrasada a concentración equivalente a B + D. S: Dieta común de bioterio. Se alimentó con esta dieta a animales subnutridos (Ss) y normales (Sn). Estas dietas experimentales son isocalóricas y poseen todas las vitaminas y minerales necesarios para cumplir con los requerimientos de las ratas según A. Harper. Se realizaron las siguientes determinaciones: consumo de dieta, velocidad de crecimiento, volemia y % de incorporación de Fe^{59} a los eritrocitos 48 h después de la inyección del radioisótopo. Los resultados obtenidos son los siguientes: Para velocidad de crecimiento e incorporación de Fe^{59} fueron: Dieta B: (1.10 ± 0.19; 48.12 n = 20). Dieta D: (2.79 ± 0.30; 70.9 ± 2.40 (n = 15). Dieta C: (3.87 ± 0.32; 78.4 ± 6.3) (n = 7). Dieta Ss: (4.15 ± 0.40; 90.9 ± 4.3) (n = 8). Dieta Sn: (3.27 + 0.36; 61.4 + 1.37) (n = 8). Estos datos nos indican que la incorporación de Fe^{59} a los glóbulos rojos responde a una cinética de saturación en función a la velocidad de crecimiento, no pudiendo detectarse influencias específicas del desequilibrio aminoacídico sobre la eritropoyesis.

161

Análisis de estabilidad de la resistencia a antibióticos en cepas bacterianas durante pasajes sucesivos en medio no selectivo

J. Zorzópulos, A. Ruiz Trevisán, C. D. Denoya, M. Woloj, E. Rubeglio

Instituto Sidus, Departamento Genética Molecular, Bernal y Laboratorio de Bacteriología, Hospital de Niños, Buenos Aires

La utilización de terapias con distintos antibióticos resulta en la aparición de cepas bacterianas resistentes a los mismos. Frecuentemente, cuando un paciente no responde al tratamiento con determinado antibiótico se suspende por cierto tiempo la medicación y se procede a analizar mediante antibiogramas la susceptibilidad de la bacteria infectante recogida en medios no selectivos. Sin embargo, éste puede no ser el camino correcto a seguir debido a que la resistencia a los antibióticos de las cepas bacterianas aisladas de este modo, puede no reflejar la resistencia real del germen durante el tratamiento. Nosotros hemos investigado la estabilidad de la resistencia a antibióticos en dos tipos de bacterias: *a*) Klebsiellas multirresistentes incluyendo los antibióticos Ampicilina y Gen-

tamicina, y *b*) Pseudomonas multirresistentes, incluyendo los antibióticos Ampicilina y Amikacina. En una primera etapa se analizaron dos Klebsiellas y una Pseudomona. Se cultivó cada cepa en medio selectivo (caldo + una Pseudomona. Se cultivó cada cepa en medio selectivo (caldo + antibióticos) y no selectivo (caldo sin antibióticos) durante 24 h y se repicó 5 veces cada una en ambos medios. Al término del 5º repique se realizó antibiograma y Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para cada cepa. Tanto el antibiograma como la CIM para Ampicilina, Fosfomicina, Gentamicina, Tobramicina, Sisomicina y Amikacina fueron idénticas en las Klebsiellas mantenidas en medios no selectivo y selectivo (Ampicilina 40 μg/ml v Gentamicina 20 μg/ml). Por el contrario, la *Pseudomona sp* analizada perdió gran parte de sus resistencias al ser replicada en medio no selectivo. Esta cepa presentó los siguientes valores de CIM (μg/ml) siendo el primer valor para las bacterias crecidas en medio selectivo (caldo con Amikacina 45 μg/ml) y el segundo para las crecidas en medio no selectivo: *a*) Amikacina: 32/2; *b*) Tobramicina: 32/< 0.5; *c*) Sisomicina: > 32/< 0.5; *d*) Gentamicina: > 64/8, y *e*) Fosfomicina: 16/16. Se concluye que para algunos casos clínicos sería conveniente aislar el germen antes de suspender la antibioticoterapia y mantener las bacterias en medio selectivo hasta el momento de su análisis, permitiendo obtener un valor de las resistencias que la cepa bacteriana posee más aproximado a los niveles de la cepa original que infecta al paciente.

162

Acción de suspensiones de Mycobacterium leprae *sobre la función fagocitaria y lítica de polimorfonucleares neutrófilos de hansenianos frente a* Candida albicans *y* Candida pseudotropicalis

E. L. Fliess, Gabriela Franceschini, María C. Ortiz

CEFYC, Sanatorio Nacional B. Sommer, General Rodríguez

Se estudió la fagocitosis y lisis de *Candida albicans* y *Candida pseudotropicalis* y el posible efecto de suspensiones de *Mycobacterium leprae (M. leprae)* sobre estas funciones en 32 pacientes con hanseniasis virchowiana, 17 quiescentes (VQ) y 15 con episodios reaccionales (VR) y en 15 testigos sanos (TS). Los polimorfonucleares se incubaron durante una hora sobre portaobjetos de vidrio con suspensiones de *Candida albicans* y *Candida pseudotropicalis* en medio TC 199 (Difco) en una concentración de 1 x 10^6 por mililitro, con y sin adición de *M. leprae* en una concentración de 1 x 10^8 bacilos por mililitro coloreándolos para su observación microscópica con May Grünwald-Giemsa. Se tomó en cuenta el número de levaduras fagocitadas por 100 neutrófilos y el porcentaje de las mismas que había sido lisado. Los valores medios obtenidos y sus errores estándar (ES) fueron los siguientes: *Fagocitosis de Candida albicans:* VQ: 290 ES 21; VR: 318 ES 18; TS: 323 ES 37; *Fagocitosis de Candida albicans + M. leprae:* VQ: 284 ES 1; VR: 331 ES 21; TS: 312 ES 20; *Fagocitosis de Candida pseudotropicalis*: VQ: 308 ES 37; VR: 329 ES 28; TS: 316 ES 17; *Fagocitosis de Candida pseudotropicalis + M. leprae:* VQ: 301 ES 31; VR: 336 ES 18; TS: 329 ES 24; *Lisis de Candida albicans:* VQ: 37 % ES 2; VR 38 % ES 3; TS: 37 % ES 2; *Lisis de Candida albicans + M. leprae:* VQ: 36 % ES 1; VR: 38 % ES 1; TS: 39 % ES 2; *Lisis de Candida pseudotropicalis:* VQ: 34 % ES 1; VR: 35 % ES 1; TS: 36 % ES 3; *Lisis de Candida pseudotropicalis + M. leprae:* VQ: 34 % ES 2; VR: 37 % ES 1; TS: 37 % ES 1. El análisis estadístico de los resultados mediante el test de la varianza no arroja diferencias significativas entre los distintos grupos estudiados ($p > 0.2$) tanto para la fagocitosis como para la lisis de levaduras. Esto indica que la actividad candidicida de los sistemas peroxidasa-H_2O_2-haloide y peroxidasa independiente es similar en los neutrófilos de pacientes hansenianos y testigos sanos, y que las reacciones hansenianas no inciden sobre la misma. La incubación simultánea de los neutrófilos con levaduras y *M. leprae* no modifica los valores medios de fagocitosis y lisis de *Candida albicans* y *Candida psedoutropicalis* en forma significativa en ninguno de los grupos estudiados (p >

0.2). A la inversa de lo referido por otros autores sobre la facilitación de una acción amebicina de los neutrófilos mediante incubación simultánea con *M. leprae*, nuestros resultados no permiten hablar de un incremento de la acción candidicida en presencia de *M. leprae*, ni en pacientes hansenianos ni en testigos sanos.

163

Actividad bactericida de los neutrófilos en pacientes con infecciones moderadas y graves evaluadas por prueba estimulada de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT)

A. Merelli, N. W. de Contardi, D. B. I. Goldenberg, J. J. Poderoso, C. A. Biancolini, J. C. Pico, C. R. Gherardi, M. A. Jorge

División Terapia Intensiva, Departamento de Análisis Clínicos, Hospital de Clínicas, José de San Martín, Facultad de Medicina y Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

La prueba de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) ha sido utilizada como medida de la función bactericida de los neutrófilos. Resultados positivos han sido hallados especialmente en pacientes con infecciones bacterianas. En controles normales o en presencia de infecciones virales, los valores bajos de reducción del NBT fueron considerados como resultados negativos. En los pacientes con sepsis grave el importante compromiso sistémico puede asociarse a una disfunción del sistema fagocitario. El presente trabajo tuvo por objeto medir la actividad bactericida de los neutrófilos en pacientes con infecciones bacterianas moderadas y en pacientes con sepsis grave mediante una prueba estimulada de reducción del NBT. Se incluyeron 12 pacientes con infección bacteriana probada, cuyo foco infeccioso fue controlado satisfactoriamente y 20 pacientes con sepsis grave. El diagnóstico de sepsis grave se efectuó por la existencia de foco infeccioso mayor con cultivo positivo y uno o más de los siguientes criterios: 1) Compromiso de 2 o más parénquimas. 2) Shock séptico. 3) Metástasis séptica. 4) Hemocultivos positivos. El estudio se realizó además en 17 controles. Para medir la actividad bactericida de los neutrófilos se adoptó un método cuantitativo basado en una modificación de la técnica de Stossel. Esta es colorimétrica y consiste en hacer contactar una suspensión de neutrófilos estimulados en concentración conocida con NBT, que se convierte en formazán en un medio reductor compitiendo con el oxígeno por la captación de electrones. El formazán se extrae con dioxano y se lee en el espectrofotómetro a 525 nanómetros, siendo la densidad óptima directamente proporcional a la actividad bactericida. Se expresa como microgramos de formazán / 10^7 neutrófilos ($\mu g/10^7$). Las partículas estimulantes utilizadas fueron *Staphilococcus epidermis* catalasa positivos, germen de fácil obtención en el medio hospitalario. Los resultados revelaron una actividad bactericida de 206.35 ± 17.42 para los normales; de 333.35 ± 24.27 para los pacientes con infecciones menores, y de 84.20 ± 9.28 para los pacientes con sepsis grave. Efectuado el análisis de varianza se comprobó que las diferencias fueron estadísticamente significativas entre los tres grupos ($F = 55.5$). Estos datos demuestran valores altos de reducción del NBT en los pacientes con infecciones bacterianas de menor magnitud, y una inhibición en la respuesta neutrófila en los pacientes con sepsis grave. Podría inferirse la existencia en los pacientes sépticos de un defecto adquirido para reducir el NBT aún en presencia de estimulación. La naturaleza de este daño permanece desconocida. Han sido postulados inhibidores plasmáticos de la reducción del NBT.

164

Actividad bactericida de los neutrófilos en pacientes sépticos con compromiso renal evaluada por prueba estimulada de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT)

D. B. I. Goldenberg, J. J. Poderoso, A. Marelli, N. W. de Contardi, C. A. Biancolini, C. R. Gherardi, J. C. Pico, M. A. Jorge

División Terapia Intensiva, Departamento de Análisis Clínicos, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina y Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

En los pacientes urémicos el diagnóstico clínico de infección bacteriana puede ser

dificultoso por la frecuente ausencia de signos tales como fiebre y leucocitosis. La prueba de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) es de utilidad en el diagnóstico de infección bacteriana en estos pacientes pues sus neutrófilos poseen actividad bactericida y conservan la propiedad de reducir el NBT. El presente trabajo tuvo por objeto comprobar si dicha propiedad se conserva en los pacientes con sepsis severa y compromiso renal mediante la evaluación cuantitativa de su actividad bactericida con una prueba estimulada de reducción del NBT. Se adoptó un método colorimétrico basado en una modificación de la técnica de Stossel. Esta consiste en contactar una suspensión de neutrófilos estimulados en concentración conocida con NBT, que posee la capacidad de convertirse en formazán en un medio reductor compitiendo con el oxígeno por la captación de electrones. El formazán se extrae con dioxano y se lee en el espectrofotómetro a 525 nanómetros, siendo la densidad óptica directamente proporcional a la actividad bactericida. Esta se expresa como microgramos de formazán / 10^7 neutrófilos ($\mu g/10^7$). Las partículas estimulantes utilizadas fueron *Staphilococcus epidermis* catalasa positivos, germen de fácil obtención en el medio hospitalario. El estudio incluyó 12 pacientes con sepsis y uremia, 8 mujeres y 4 hombres con edades entre 29 y 74 años (promedio: 46.18). Se estudiaron además 17 controles. El diagnóstico de sepsis se estableció por la existencia de foco infeccioso mayor con cultivo positivo y uno o más de los siguientes criterios: 1) Compromiso de 2 o más parénquimas. 2) Shock séptico. 3) Metástasis séptica. 4) Hemocultivos positivos. Todos poseían cifras de uremia superiores a los 100 mg %. De los 12 pacientes, 3 desarrollaron I.R.A., debiendo ser hemodializados 2 de ellos. Además, 8 evolucionaron desfavorablemente desarrollando durante su evolución un cuadro de shock séptico. Los estudios revelaron una actividad bactericida de 83.5 $\pm$ 15.05 para los pacientes y de 206.35 $\pm$ 17.42 para los controles, siendo la diferencia entre ambos grupos estadísticamente significativa ($p < 0.001$). No existió correlación entre la actividad bactericida y las cifras de uremia ($R = 0.5312$). Los datos demuestran un defecto para reducir el NBT en presencia de estimulación en los pacientes sépticos severos con compromiso renal. Si bien este método demostró ser de utilidad para el diagnóstico de infección bacteriana en los pacientes urémicos aún sometidos a inmunosupresión, los valores bajos de reducción del NBT obtenidos en nuestros pacientes revelan una inhibición en la magnitud de la respuesta neutrófila. Esta disfunción parece no depender de la uremia pues en procesos infecciosos de menor gravedad la actividad bactericida no se ve alterada. Podría inferirse la existencia de un defecto reversible y adquirido en el proceso metabólico responsable de la reducción del NBT, dependiente quizás de la gravedad del proceso séptico.

165

Función supresora T-T e inmunocomplejos circulantes en pacientes con enfermedad de Hansen durante el eritema nudoso lepromatoso

María del C. Sasiain, Beatriz Ruibal Ares, A. Bachmann, Amada Segal-Eiras

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina y Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Diferentes autores como Godal y Bullock han sostenido la importancia de los inmunocomplejos (IC) durante la reacción de Eritema Nudoso Lepromatoso (ENL) en la lepra lepromatosa. El depósito de IC intervendría en la patogenia de la glomérulonefritis, poliartritis y miositis observada en los pacientes. Es sabido que en los pacientes con la forma polar LL la inmunidad mediada por células está alterada, esta alteración se manifiesta en la disminución de la transformación blástica a la PHA, número absoluto de linfocitos T descendido, reacción de Mitsuda negativa y en la función supresora T-T ausente o disminuida durante la forma quiescente de la enfermedad. Sabemos que los linfocitos T supresores actúan regulando la producción de inmunoglo-

bulinas por los linfocitos B. En estudios anteriores hemos observado la alteración de la función supresora T-T en los pacientes lepromatosos sin ENL. El objetivo de este estudio fue valorar el nivel de IC y la función supresora T-T durante el ENL. Se estudiaron 11 controles normales y 10 pacientes con ENL. Los IC séricos se dosaron por el método de C1q-I^{125} parcialmente modificado por la adición de heparina. La función supresora T-T se valoró por inducción con Concanavalina A (ConA) y se observó el efecto supresor por la inhibición de la proliferación de los linfocitos a mitógenos inespecíficos (PHA y ConA). El porcentaje de inhibición se calculó por la siguiente fórmula: % inhibición = 1 − (Δ c.p.m.^{ca} / Δ c.p.m.^{na}) x 100 donde Δ c.p.m.^{ca} es la diferencia de cuentas de los cultivos preincubados con ConA (control, y estimulados; Δ c.p.m.^{na} es la diferencia de cuentas en los cultivos sin preincubación con ConA. Los controles normales estudiados inhibieron la proliferación para ambos mitógenos. Para la PHA el porcentaje varió entre 3 y 52 %. Para la Con A 16-99 %. De los pacientes estudiados con ENL, 5 de ellos inhibieron ambos mitógenos (PHA: 12-59 %; Con A: 4-73 %), 4 inhibieron la proliferación de uno de los mitógenos y 1 no mostró inhibición (PHA: −133 % y Con A: −128 %). El valor medio de los IC circulantes obtenidos en los normales fue de 6.60 % y en los pacientes 11.47 %, con una $p < 0.01$. En los resultados obtenidos podemos observar el nivel elevado de IC circulantes y la función supresora T-T parcialmente restablecida durante el ENL. Durante el episodio reaccional se produce liberación súbita de bacilos de los macrófagos tisulares que proveen una gran carga antigénica la cual produciría el alto nivel de IC y el restablecimiento de los mecanismos inmuno-reguladores de la supresión que impediría el daño tisular producido por la extravasación de los IC que al depositarse en las membranas basales del riñón conducen a la glomérulonefritis, complicación más frecuente y severa observada en el ENL.

166

Efecto del carbonato de litio en la función leucocitaria

E. Lazarowski, Adriana Blasetti, Norma Tartas, J. Sánchez Avalos, R. D. Chacón

Hospital Privado Güemes, Buenos Aires

El aumento de neutrófilos inducido por el carbonato de litio ha hecho que se lo emplee en las neutropenias provocadas por tratamientos quimioterápicos. Estudios en controles normales mostraron que una alteración funcional leucocitaria inducida simultáneamente por el litio podría contrarrestar este efecto beneficioso. En el presente trabajo se investigaron los cambios en la capacidad funcional neutrófila de 8 voluntarios normales, 4 de los cuales recibieron carbonato de litio (900 mg/día/ 7 días), efectuándose los estudios antes y después de dicho tratamiento. Iguales parámetros fueron investigados en 8 pacientes neoplásicos con quimioterapia y tratamiento con carbonato de litio (900 mg/día), en 5 de los cuales se repitieron los estudios luego de suspendido el litio. La fagocitosis y bactericidia fueron estudiadas con la técnica de incubación de los leucocitos en presencia de *Staphylococcus aureus*. La capacidad de reducción del NBT (*Nitroblue Tetrazolium*), según la técnica de Park (citoquímica). Los controles normales en el período sin litio mostraron una fagocitosis del 69.8 % una bactericidia del 91 % y una reacción de NBT del 67 %. Luego de recibir litio, la bactericidia disminuyó a 80 % ($p < 0.02$), no siendo significativos los cambios en la fagocitosis ni en la reducción del NBT. Los pacientes neoplásicos con quimioterapia mostraron, en el período sin litio, una fagocitosis del 61 %, una bactericidia del 90,7 % y una reacción de NBT de 66 %. En el período con litio, la bactericidia disminuyó a 76 % ($p < 0.01$), no siendo significativos los cambios en la fagocitosis (53 %) ni en el NBT (66 %). Si bien tanto en los controles normales como en los pacientes neoplásicos, el tratamiento con carbonato de litio disminuyó el poder bactericida, no se observaron cambios en la fagocitosis ni en el test de

NBT. Sin embargo esta alteración no llega a tener la magnitud para contrarrestar el efecto favorable del nivel de neutrófilos. (Controles normales, sin litio PMN = 4480/mm^3, con litio PMN = 7200/mm^3. Aumento de 62.2 %. Pacientes con quimioterapia, sin litio PMN = 2730/mm^3, con litio PMN = 4940/mm^3. Aumento de 55.2 %).

167

Factores de virulencia en cepas de Escherichia coli *K1 aisladas de infecciones extraintestinales en niños*

M. A. Valvano, Mabel Woloj, Etelvina Rubeglio, S. Grinstein

Laboratorio de Virología-Serología, Sección Bacteriología, Hospital de Niños, Buenos Aires

Algunos serotipos de *Escherichia coli* invaden al huésped causando infecciones extraintestinales. El estudio de esas cepas provee datos acerca de diferentes factores vinculados con su virulencia. La portación de antígenos capsulares acídicos K, la capacidad de producir hemólisis, la propiedad de aglutinar glóbulos rojos humanos (GR) en presencia de manosa y la avidez por el Fe sérico, han sido descriptos como marcadores de virulencia en *E. coli* invasivas. Las infecciones provocadas por cepas K1 son particularmente frecuentes en el recién nacido y tienen menor prevalencia en edades mayores. Los propósitos de este trabajo son: *a)* comunicar los hallazgos obtenidos en la pesquisa de cepas de *E. coli* portadores del antígeno K1 provenientes de infecciones extraintestinales en niños, y *b)* determinar sus propiedades aglutinantes frente a GR, considerando que las mismas podrían constituir un marcador de la adhesividad de *E. coli* K1 a células del organismo. Se estudiaron *E. coli* aisladas de infecciones urinarias (53 casos), hemocultivos (22), líquido cefaloraquídeo (7) y de otros focos (18). Las bacterias se mantuvieron en estrías de agar-peptona a 4° C y a −20° C en glicerina al 50 %. La presencia de antígeno K1 se detectó por aglutinación empleando suero anti-*Neisseria meningitidis* Grupo B (que presenta reacción cruzada con ese antígeno). Las cepas K1 positivas se ensayaron por hemaglutinación como ha sido descripto por otros autores. El 41 % de los aislamientos poseía el antígeno K1, siendo éste más frecuente en cepas provenientes de niños menores de 2 meses (30 %). El 60 % de las cepas K1 positivas aglutinaron los GR humanos, siendo esta propiedad resistente a la acción de la manosa. Este azúcar bloquea la capacidad adhesiva de los pili tipo I. Nuestros resultados coinciden con los de otros autores y apoyan la idea de que las bacterias K1 positivas poseen otros tipos de pili involucrados en la adherencia. La hemaglutinación podría constituir un modelo para el ensayo de drogas que la bloqueen, lo cual permitiría conocer los aspectos bioquímicos vinculados a la adhesividad de cepas virulentas a células humanas. El uso de terapéuticas de bloqueo de la colonización bacteriana, en especial en el recién nacido significaría una alternativa no antibiótica para el control de estas infecciones.

168

Valor pronóstico de la cuantificación de antígenos capsulares de Haemophilus influenzae *tipo B en líquido cefalorraquídeo*

M. A. Valvano, S. Grinstein

Laboratorio de Virología-Serología, Hospital de Niños, Buenos Aires

El tratamiento antibiótico adecuado de las meningitis causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) ha disminuido su mortalidad; pero no ha reducido sus secuelas neurológicas. El conocimiento de la magnitud de la infección meníngea permitiría determinar mejor sus modalidades clínicas, establecer bases firmes para predecir su pronóstico y motivar la pesquisa precoz de secuelas. La gravedad de una infección depende principalmente del número de bacterias que invaden al huésped. La concentración de antígenos capsulares en el líquido cefalorraquídeo (LCR) inicial refleja el inóculo de gérmenes; por lo tanto, la cuantificación de los mismos tendría utilidad como indicador de la magnitud de la infección y posibilitaría la predicción del pronóstico de niños con meningitis. El presente trabajo evalúa la utilidad de la contrainmunoelectroforesis

(CIE) en la cuantificación de antígenos de Hib en LCR y establece en qué medida las concentraciones detectadas pueden constituir un indicador de pronóstico. Se estudiaron 28 niños internados por meningitis causada por Hib durante el transcurso de un año, evaluando los síntomas al ingreso y su evolución ulterior. Se consideró buena evolución a la ausencia de secuelas neurológicas aparentes al alta. Las concentraciones de antígeno capsular de Hib, poliribosafosfato (PRP), se midieron por CIE semicuantitativa, comparando esta técnica con el electroinmunoensayo (EIE). Las sensibilidades de ambas metodologías fueron 0.2 y 0.8 μ/ml, respectivamente. Existió una correlación positiva significativa entre las dos técnicas. Se observaron secuelas en 8 pacientes (hidrocefalia, colección subdural, paresias y atrofia cortical), 4 fallecieron y los restantes 16 no presentaron secuelas evidentes al alta. Los enfermos fallecidos y los que desarrollaron secuelas presentaron concentraciones de antígeno capsular PRP en el LCR inicial significativamente superiores a las de los pacientes con buena evolución ($p < 0.005$). Sin embargo, 6 pacientes de este último grupo tuvieron concentraciones iniciales similares a las de aquellos con secuelas. En los niños con valores iniciales inferiores a 2 μg/ml de PRP no se detectó este antígeno en los LCR de las 48 h y del 7º día; y todos presentaron buena evolución. De los pacientes con concentraciones iniciales mayores a 2 μg/ml, 6 (33 %) evolucionaron favorablemente v las concentraciones de PRP en los LCR ulteriores fueron significativamente menores que las de los restantes 8 niños que evolucionaron desfavorablemente. Cuando las concentraciones de PRP iniciales son menores de 2 μg/ml puede predecirse buena evolución en el 100 % de los casos. En cambio, la inversa no es cierta. Esto sugiere que además del inóculo bacteriano hay otros factores vinculados con la gravedad de la infección que dependen de la capacidad del huésped para depurar bacterias. La caída de la antigenorraquia en los LCR ulteriores permitiría estimar esta capacidad. La medición de PRP en LCR, por lo tanto, aporta datos que permiten una mejor comprensión de las interrelaciones huésped-Hib al estimar la magnitud de la infección y la capacidad de respuesta del huésped, y que además tiene utilidad clínica como indicadores de pronóstico.

169

Adhesión bacteriana a catéteres de sistemas valvulares para el tratamiento de hidrocefalia

C. D. Denoya, A. Ruiz Trevisán, J. Zorzópulos, G. Zúccaro, J. A. Guevara

Instituto Sidus, Departamento Genética Molecular, Bernal, División Neurocirugía, Hospital de Niños, Unidad Neurocirugía, Hospital Fernández, Buenos Aires

El tratamiento de elección para la hidrocefalia es la implantación de un sistema valvular de derivación del líquido cefalorraquídeo (LCR) desde la cavidad ventricular al torrente sanguíneo (derivación V-A) o al peritoneo (V-P). No obstante, las complicaciones son frecuentes, siendo las principales la infección y la obstrucción. Por otra parte, en un trabajo anterior, describimos que los catéteres utilizados en este tipo de sistemas, al ser analizados por microscopía electrónica de barrido, presentan numerosas imperfecciones (rugosidades, poros, fallas de polimerización, etc.) que se agravan con el tiempo de implante (Guevara y col., *Child's Brain* 1981, 8 (4): 284-293). El objetivo del presente trabajo fue indagar en los mecanismos y factores que intervienen en el desarrollo de las infecciones intraventriculares de pacientes con derivaciones V-A o V-P. Con este fin se analizaron: *a)* Pasaje de gérmenes a través de los catéteres. *b)* Adherencia de gérmenes en catéteres. *c)* Selección de cepas bacterianas con mayor capacidad de adherencia. Los resultados obtenidos fueron, en forma resumida, los siguientes: *a)* Los catéteres presentan perforaciones de hasta 30-40 μm de diámetro en su superficie. Sin embargo, estas perforaciones no comunicarían la cara externa con la luz del catéter, por lo menos a través de canales suficientemente amplios, ya que *Stafilococo aureus* es incapaz de pasar a través, no así sustancias radiactivas como la Uridina (^{3}H) que sí lo puede hacer. *b)* Mediante un diseño experimental que simula un sistema

de derivación, se comprobó la capacidad de adherencia de las especies bacterianas más frecuentemente aisladas de pioventriculitis (*Stafilococus aureus, St. epidermidis, E. coli, Klebsiella sp.*, etc.). Usando un flujo de LCR cercano al fisiológico (aprox. 0.1 ml/min), todas las cepas fueron capaces de mantenerse adheridas a los catéteres. Sin embargo, utilizando un flujo más fuerte fue posible detectar una *Klebsiella* con una capacidad de adherencia inusual. Esta cepa, proveniente de un paciente portador de un sistema infectado, resiste adherida al catéter flujos de 5ml/seg, utilizando lavados de solución fisiológica de 100-200 ml. Bajo las mismas condiciones, Klebsiellas hospitalarias aisladas de otras patologías son lavadas en los primeros 10 ml. Se concluye que los catéteres utilizados en los sistemas V-P son fácilmente colonizables por gérmenes, y que además algunas cepas hospitalarias pueden seleccionarse por sus características inusuales de adherencia. El diseño experimental aquí presentado permitirá además el análisis de los mecanismos de adherencia y factores que puedan inhibir esta capacidad.

170

Influencia del ayuno sobre la captación, metabolismo y receptores de andrógenos en hipotálamo, hipófisis y la retroalimentación hipófiso-gonadal

R. S. Calandra, J. L. S. Barañao, Isabel A. Lüthy, Bárbara Spyra, K. M. Pirke

Laboratorio de Esteroides, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires y Max-Planck Institut für Psychiatrie, München, RFA

Ha sido demostrado que el ayuno (Ay) prolongado en ratas machos ocasiona un aumento en la sensibilidad de la retroalimentación testosterona (T) - LH (*Acta Endocr Kbh* 96: 413, 1981). Dentro de los mecanismos involucrados en esta mayor sensibilidad, la conversión de T → Dihidrotestosterona (DHT) podría ser una de las alteraciones presentes, debido a que la DHT es el principal andrógeno relacionado con la retroalimentación hipotálamo-hipofisaria. En el presente trabajo se determinó en ratas adultas castradas y sometidas a 5 días de Ay, la captación in vivo e in vitro, de T - (^{3}H) en hipotálamo e hipófisis, la conversión de T – (^{3}H) → DHT y 3 α - Androstanediol (Diol) y los receptores de andrógenos (RA) en el citosol de ambos tejidos. Asimismo, se estudió la retroalimentación DHT - LH implantando tubos de silástico con diferentes cantidades de DHT y determinándose *a posteriori* los niveles séricos de DHT y LH en el grupo en Ay con o sin DHT (controles, C). Los resultados obtenidos fueron: 1) luego de la inyección E - V de T - (^{3}H) se observó un mayor ($p < 0.05$) T $\frac{1}{2}$ en plasma, en la captación total y el contenido de T, DHT y Diol - (^{3}H) a los 15 y 30 min en hipotálamo de ratas en Ay vs C. Si bien la captación en hipófisis fue significativamente mayor a los 15 min, este efecto resultó ser aparente; 2) la incubación in vitro de cortes de hipotálamo con T - (^{3}H) señaló un mayor ($p < 0.05$) incorporación total y en el contenido de T y DHT en ratas en Ay. En contraposición, la captación total y el contenido de T, DHT y Diol resultó ser menor ($p < 0.05$) en hipófisis de ratas en Ay vs C. Sin embargo, en todos los casos, la relación compuestos 5 α - reducidos/T fue constante, indicando que las diferencias en la conversión dentro del tejido son debidas a cambios en la captación de T; 3) el número de RA fue mayor ($p < 0.01$) en hipotálamo de ratas en Ay vs C (fmoles/mg proteína/órgano/g tejido). En hipófisis también se observó un incremento ($p < 0.05$) en RA (fmoles/mg proteína/g tejido), pero no en el contenido total/órgano; 4) el efecto inhibitorio de los andrógenos sobre la secreción de LH, demostró que tubos de silástico de 3 mm en ratas en Ay y de 6 mm en C, originaron iguales niveles séricos de DHT. Sin embargo, la LH en suero fue mayor ($p < 0.01$) en el grupo C. Estos resultados son similares a los demostrados previamente implantando tubos con T. En conclusión, las modificaciones halladas en la actividad 5 α - reductasa en el hipotálamo y la hipófisis no parecieran poder explicar los cambios que se originan durante el Ay en la retroalimentación del eje T - LH. Por otro lado, el aumento en la captación y en los RA bien podrían, sumados a la alteración en la liberación de LH - RH previamente hallada, contribuir

a la incrementada sensibilidad detectada en este modelo.

171

Regulación por prolactina de los sitios receptores para estradiol y prolactina en la glándula adrenal de rata

ISABEL A. LÜTHY, R. S. CALANDRA, E. H. CHARREAU

Laboratorio de Esteroides, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Nuestro grupo ha caracterizado y estudiado la regulación de sitios de unión específica para estradiol en adrenal en ciertas condiciones (*J Ster Biochem* 13: 1331, 1980) y para prolactina (Prl) por esteroides sexuales (*J Endocr* 89: 317, 1981). En el presente trabajo se estudió el efecto de Prl y de agentes que modifican sus niveles plasmáticos, tales como la Bromoergocriptina (Br) y Sulpirida (S) sobre el peso adrenal y sus receptores para estradiol (RE) y para Prl (RP). Ratas machos de 30 días de edad, inyectadas SC con Br en las dosis de 0.75, 1..5 y 3 mg/kg peso/día durante 10 días presentaron un aumento lineal con la dosis en el peso del tejido (mg $\pm$ ES) que fue significativo solamente a la dosis mayor (C: 24.7 $\pm$ 1.13; Br 0.75 : 25 $\pm$ 1.71; Br 1.5 : 27.7 $\pm$ 1.32, Br 3 : 30.8 $\pm$ 1.36; $p < 0.05$) .Igual esquema de tratamiento con S (3 mg/rata/día)originó un descenso significativo en el peso adrenal (C: 24.4 $\pm$ 1.51; S: 19.7 $\pm$ 1.06; $p < 0.05$), mientras que la administración de Prl ovina (Prl-o 50 y 500 μg/rata/día, en dos dosis diarias) no produjo cambios significativos en el peso de la glándula. La determinación de los RE libres en el citosol, expresados en fmoles/mg proteína, se incrementaron significativamente en los tres grupos tratados con Br (C: 7.6 $\pm$ 0.36; Br 0.75 : 10.2 $\pm$ 0.36; Br 1.5 : 11.0 $\pm$ 0.23; Br 3 : 13.3 $\pm$ 0.35; $p < 0.05$). Por el contrario, tratamiento con S y las dos dosis de Prl-o, produjeron una disminución significativa de los RE (C: 11.1 $\pm$ 1.73; S: 5.2 $\pm$ 1.07; $p < 0.01$; Prl-o 50 : 10.7 $\pm$ 0.98; Prl-o 500 : 8.2 $\pm$ 0.75; $p < 0.05$). Los RP totales (fmoles/mg proteína), medidos por desaturación in vitro con Cl_2Mg 4M, indicaron que Br a las dosis administradas indujo un aumento significativo tipo dosis-respuesta (C: 125.2 $\pm$ 2.84; Br 0.75 : 203.8 $\pm$ 4.43; Br 1.5 : 213.1 $\pm$ 7.58; Br 3 : 251.3 $\pm$ 10.38; $p < 0.05$), mientras que Prl-o originó el efecto opuesto (C: 198.7 $\pm$ 12.17; Prl-o 50 : 52.9 $\pm$ 5.00; Prl-o 500 : 38.8 $\pm$ 4.76; $p < 0.05$). Por último, se analizó el efecto in vitro de distintas concentraciones de Br (10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} M) y S (10^{-4} . 10^{-6} M) sobre los RE en el citosol. Los resultados obtenidos indican una inhibición competitiva por estas drogas. El aumento de peso de adrenal hallado con Br y la disminución encontrada con S, podrían interpretarse como un efecto directo de ambas drogas sobre la glándula. La linealidad del efecto Br y la inhibición competitiva de ambas drogas sobre los RE avalarían esta posibilidad. En cuanto a la regulación de los RE v RP, si bien se encuentra un efecto dosis-respuesta con Br, extrapolando las rectas a concentración nula, el valor hallado es apreciablemente mayor que el C. En el caso de S, la coincidencia de la regulación entre Prl-o y esta droga sugieren consistentemente que el efecto más importante observado para Br y S se debe a modificaciones en los niveles de Prl circulante.

172

Efecto de la insulina (Ins) y prolactina (Prl) en la regulación de la actividad esteroidogénica de las células luteales

MARTA TESONE, VIOLETA A. CHIAUZZI, R. M. OLIVEIRA-FILHO, E. H. CHARREAU

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Está establecido que la función en las células luteales está regulada por la acción de hormonas hipofisarias. Por otra parte la insulina tiene influencia en la regulación y mantenimiento de la función ovárica. En este estudio se determinó la acción de la Ins y Prl en la producción in vitro de Progesterona (P) y AMPc por células luteales de ratas hembras seudopreñadas. En ratas diabéticas por estreptozotocina la estimulación in vitro de células luteales con concen-

traciones crecientes de hCG (0.01 - 10 ng) muestra una producción de P disminuida a dosis submáxima de gonadotrofina, mientras que la respuesta máxima es igual que en los controles, indicando una falla en la sensibilidad a hCG. Estos resultados se correlacionan con la disminución de receptores para hormona luteinizante observada en células luteales de estos animales. Terapia sustitutiva con insulina a ratas diabéticas produce una respuesta a hCG superior a la observada en controles. El efecto de la Prl sobre la función luteal se estudió en ratas hembras prepúberes hiper o hipoprolactinémicas. La hiperprolactinemia se provocó por inyección de Prl ovina (oPrl) (0.5 mg/kg peso/día en dos dosis diarias) o por sulpiride (S) (3 mg/kg peso/día). Animales hipoprolactinémicos se obtuvieron por inyección con bromocriptina (Br) (3 mg/kg peso/día en dos dosis diarias). En todos los casos el tratamiento se realizó durante 10 días. Los niveles séricos de Prl (ng/ml) fueron: controles (C) $= 9.55 \pm 1.6$, S $= 42.48 \pm 2.7$, $p < 0.001$; Br $= 0.75 \pm 0.2$, $p < 0.01$). La estimulación in vitro de células luteales con una concentración estimulatoria máxima de hCG (10 ng) produjo un aumento significativo en la producción de P en animales hiperprolactinémicos (% estimulación : C $= 39 \pm 5$, oPrl $= 59 \pm 7$, $p < 0.05$, S $= 147 \pm 8$, $p < 0.01$). Contrariamente, en las células luteales de animales hipoprolactinémicos la producción de P se vio significativamente disminuida (Br $= 6 \pm 1$, $p < 0.01$). La producción de AMPc en estas incubaciones se correlaciona con lo observado para P (% estimulación : C $= 456 \pm 92$, oPrl $= 872 \pm 133$, $p < 0.05$; S $= 2428 \pm 274$, $p < 0.001$; Br = no detectable). Por otra parte, ni S ni Br tienen efecto in vitro sobre la producción de P por células luteales. En estudios in vitro con células luteales la Ins produjo un aumento de la producción de P (% estimulación : Ins 4×10^{-8} M $= 38 \pm 4$, 4×10^{-7} M $= 89 \pm 6$). Estudios similares realizados con Prl en concentraciones: 1×10^{-8} M, 1×10^{-7} M y 1×10^{-6} M produjeron un aumento en el % de estimulación de P : 57 ± 8; 69 ± 5 y 92 ± 10, respectivamente. Estos resultados sugieren que la Ins y Prl participan en la regulación de la actividad esteroidogénica de las células luteales.

173

Relación entre la liberación de gonadotrofinas y la síntesis de ADN en la hipófisis de rata. Efecto de la castración y de los esteroides sexuales

GLORIA A. MACHIAVELLI, GRACIELA A. JAHN, MARÍA I. ROMANO, J. A. BURDMAN

Cátedra de Química Biológica Patológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Se observó una estrecha relación entre los cambios en la liberación de prolactina y la síntesis de ADN hipofisario, lo cual sugiere que la velocidad de secreción de la hormona sería un factor regulador de la proliferación de células prolactínicas. Con el objeto de investigar si este mecanismo de regulación también es operativo en otras clases de células hipofisarias, se decidió estudiar el efecto de los cambios en la secreción de gonadotrofinas sobre la replicación de ADN. Los factores que modifican la secreción de esas hormonas son: 1) la administración de esteroides sexuales, que por efecto retrocontrol negativo producen una disminución en la liberación de gonadotrofinas; 2) la castración, que provoca un marcado aumento en los niveles séricos de LH y FSH, y 3) el factor hipotalámico LH-RH, que es un potente liberador de gonadotrofinas. Decidimos estudiar si las variaciones en la secreción de gonadotrofinas, producidas por estos factores se acompañan de cambios en la síntesis de ADN de la adenohipófisis. Se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos, que se dividieron en los siguientes grupos: 1) ratas controles no castradas; 2) ratas controles castradas 15 días antes del sacrificio, y 3) animales castrados que se inyectaron 3 días antes del sacrificio con diferentes dosis de *a*) estrógenos; *b*) testosterona, y *c*) dihidrotestosterona. En estos animales se midió la síntesis de ADN en la adenohipófisis por incorporación de timidina tritiada in vitro. Las gonadotrofinas séricas se deter-

minaron por radioinmunoensayo. La castración de las ratas macho produce un aumento en los niveles séricos de LH y una marcada estimulación en la síntesis de ADN hipofisario, que se acompaña de un aumento significativo en el peso de la glándula (6.6 mg en ratas intactas y 8.0 en castradas). Los estrógenos en dosis mayores de 5 μg producen una estimulación en la síntesis de ADN que varía de 4 % para 5 μg hasta un 74 % para la dosis de 50 μg. Debido a las fluctuaciones en la síntesis de ADN durante el ciclo sexual en hembras, sólo se utilizaron hembras castradas. En éstas, la dosis de 1 μg de estrógeno lleva a una inhibición tónica en la secreción de gonadotrofinas y a una disminución en la síntesis de ADN (24 %). Con dosis mayores se observa un efecto estimulatorio semejante al observado en machos (acción mitogénica sobre las células prolactínicas). La administración de testosterona tiene efectos leves y variables con la dosis, sobre la incorporación de (^{3}H) timidina en ambos sexos. (Se aromatiza a estrógenos.) La dihidrotestosterona tiene un efecto inhibitorio marcado que es de 32% en machos y 40 % en hembras. Esta terapia de reemplazo con esteroides sexuales produce siempre una inhibición en la liberación de gonadotrofinas. En base a los resultados obtenidos en ratas castradas y en las tratadas con dihidrotestosterona podemos concluir que una modificación en la secreción de gonadotrofinas produce cambios en la síntesis de ADN hipofisario. Esto indica que en el eje gonadotrofo también se cumpliría el mecanismo de regulación de la proliferación celular observado para las células prolactínicas.

174

Efecto del propranolol en ratas hipertiroideas expuestas a oxígeno hiperbárico (OHB)

R. R. Pittaluga, R. Boado, María Coumroglon, A. Zaninovich, J. A. Andrada

Instituto de Investigaciones Médicas y Laboratorio de Investigaciones Endocrinológicas, CONICET, Buenos Aires

Anteriormente demostramos la relación entre el estado previo de la función tiroidea y la aparición de convulsiones inducidas por OHB, en ratas. En el hipertiroidismo hay varios factores que favorecen esta reacción, entre ellos: el aumento de la temperatura corporal, del consumo de O_2 y ATP, del acúmulo de CO_2 intracelular, del tono simpático, etc. De todos estos aspectos interrelacionados, se optó por evaluar la hiperactividad simpática mediante el bloqueo de los receptores beta con propanolol. Se emplearon 33 ratas Wistar, machos, de 77 ± 3 días de edad, distribuidas en 4 lotes: A (control) = 8 animales eutiroideos, B (testigo) y C y D (experimentales), pretratados durante un mes con 18 μg/día de tiroxina en solución fisiológica, por vía intraperitoneal. Los lotes C y D recibieron, además, propanolol en solución a razón de 2 mg y 0.8 mg/kg de peso, respectivamente, por igual vía y 15-20 minutos antes del comienzo de la exposición a OHB. Hubo un 5º grupo medicado con 5 mg/kg de peso, del beta bloqueante, que fue descartado por presentar alta mortalidad inmediata (50 %). Los animales fueron alimentados con Forramex y agua *ad libitum*. Se empleó una cámara hiperbárica de 15 litros de capacidad y se trabajó a 22 ± 2° C y a 60 ± 20 % de humedad. La exposición a OHB fue de 180 minutos a 4 atmósferas de presión absoluta. Una hora antes del comienzo del estudio se extrajo 1 ml de sangre para dosar T 4 y TSH por radioinmunoanálisis. Los parámetros considerados fueron: *a*) el tiempo transcurrido hasta la aparición de la primera convulsión o período de latencia (PL), y *b*) el grado de protección alcanzado por cada grupo. Resultados: como se esperaba, las ratas hipertiroideas sin tratamiento fueron más sensibles al OHB que los controles (PL: 110 ± 13 vs 155 ± 12; $p < 0.01$). Las pretratadas con 0.8 mg/kg de propanolol presentaron una respuesta similar a las no tratadas (PL: 104 ± 11 vs 110 ± 13); en cambio, las que recibieron 2 mg/kg del beta bloqueante fueron mucho más resistentes que el grupo testigo (PL: 156 ± 9 vs 110 ± 13; $p < 0.005$) y semejantes en sensibilidad a las eutiroideas. Conclusiones: 1) El beta bloqueo logrado con 2 mg/kg peso de propranolol es un eficaz protector contra la inducción de convulsiones por

OHB en ratas hipertiroideas que logran un comportamiento semejante a las eutiroideas. 2) La dosis de 0.8 mg/kg es ineficaz y la de 5 mg/kg es peligrosa por sus efectos colaterales. 3) La acción protectora del propanolol es compatible con la hipótesis de una probable relación entre la sensibilidad neurotóxica del OHB y la hiperactividad simpática en el hipertiroidismo, aunque no excluya a otros factores coexistentes.

175

Obesidad hereditaria en la rata asociada a niveles plasmáticos elevados de triglicéridos

Susana Calderari de Lozano, Alicia González, A. Hechen, Elizabeth Antonio

Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

Al estudiar el crecimiento de dos líneas endocriadas: alfa y beta, vimos que a partir de la pubertad las biomasas de ambas líneas *ad libitum* con dieta habitual comienzan a divergir hasta que beta alcanza un peso 44 % superior a alfa: 617 ± 65 vs. 428 ± 50 g, ($p < 0.001$). La composición corporal indica que este mayor peso se debe al aumento de grasa total. Con el objetivo de determinar el tipo de obesidad de beta, se dosaron colesterol total y triglicéridos plasmáticos en ambas líneas utilizando test-color enzimático y test UV enteramente enzimático, respectivamente. En un estudio transversal evaluamos grupos de machos al destete, púberes y adultos. Los valores de triglicéridos hallados en adultos fueron: alfa 240 ± 87 vs. beta 451 ± 168 mg %, ($p < 0.001$). En esta edad, un 56 % de ratas beta ($n = 20$) mostró marcado aumento de trigliceridomia. El alto valor del desvío standard sería coherente con una distribución bimodal de trigliceridemia en beta. La ingestión de alimento fue equivalente en alfa y beta en toda su vida postlactante, salvo en un corto período alrededor de los 35 días de edad, en que come significativamente más beta: 21 ± 2.7 vs. 18 ± 2.6 g, ($p < 0.05$). Cuando alfa y beta se alimentan al destete con una dieta diferente, que contiene el doble de grasa y un 12 % más de glúcidos que la habitual, ya en la pubertad aumenta significativamente la trigliceridemia en beta: 398 ± 81 vs. 195 ± 99 mg %, ($p < 0.001$), pero permanece inmodificada en alfa: 160 ± 77 vs. 160 ± 82 mg %. La restricción calórica del 30 % en los períodos: *a*) destete - pubertad, y *b*) durante una semana en adultos, mostró al cabo de *a*) una disminución significativa de trigliceridemia así como de biomasa en beta ($p < 0.05$). Al cabo de *b*) las biomasas sufrieron una pequeña pero significativa disminución, equiparable para ambas líneas en cifras absolutas ($\bar{x} = 28$ g). Se notó además una disminución significativa de trigliceridemia ($p < 0.01$) a la vez que la homogeneización de los valores en ambas líneas, así como un pequeño pero significativo aumento de colesterolemia: 107 ± 15 vs. 91 ± 14 mg %, ($p < 0.01$). Este hecho podría evidenciar una remoción más eficaz de los triglicéridos que conduciría al aumento de la fracción HDL o bien a una mayor formación y menor catabolismo de LDL. Las observaciones descriptas podrían estar evidenciando en beta un desequilibrio metabólico no precisado que se manifestaría espontáneamente en adultas *ad libitum* a través de una hipertrigliceridemia debida a algún defecto en la remoción de triglicéridos o bien al incremento de la síntesis de la fracción VLDL. En ratas jóvenes el desequilibrio estaría latente y sólo ciertas modificaciones del ambiente nutricional serían capaces de ponerlo en evidencia.

176

El síndrome diabético de las ratas eSS como modelo de la diabetes humana del tipo del adulto de comienzo temprano

Stella Maris Martínez, María Cristina Tarrés, Mónica Margarita Liborio, J. C. Picena, S. L. Rabasa

Cátedra de Anestesiología, Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas, Facultad de Ciencias Médicas e Instituto de Investigaciones Médicas, Rosario

El objetivo del presente trabajo consistió en averiguar si el síndrome diabético de

las ratas de la línea e Stilmann Salgado (eSS) podía servir como modelo de algún tipo de diabetes mellitus humana. Los síndromes diabéticos de roedores suelen presentar características semejantes a la diabetes del adulto o a la diabetes juvenil. Esta caracterización de la diabetes basada en la edad de comienzo ha resultado insatisfactoria en ciertos tipos de diabetes como la diabetes humana del tipo del adulto de comienzo temprano (MODY) y el síndrome de las ratas eSS. La descripción fenotípica de la diabetes de estos roedores se ha hecho en base al estudio de la glucemia de ayuno, la tolerancia a la glucosa, la ingesta diaria de alimento y agua, la diuresis de 24 h y el estudio anatomopatológico del páncreas en animales de ambos sexos a distintas edades. Se usó como testigo ratas de la línea e del Instituto de Investigaciones Médicas de Rosario (eIIM). Se comprobó hiperglucemia en el 66 % de los machos (1.6 ± 0.5 g/l) y en el 26 % de las hembras (1.5 ± 0.3 g/l). Los testigos fueron normoglucémicos en todos los casos (0.8 ± 0.1 g/l). Las curvas de tolerancia a la glucosa analizadas utilizando los valores correspondientes al punto superior fueron significativamente más elevadas que las de los testigos en ambos sexos (Machos: 3.3 ± 0.6 g/l vs 1.6 ± 0.2 g/l; $p < 0.001$ a los 3.5 meses y 4.4 ± 0.4 g/l vs 1.8 ± 0.5 g/l; $p < 0.001$ a los 10 meses. Hembras: 2.7 ± 0.4 g/l vs 1.9 ± 0.3 g/l; $p < 0.05$ a los 3.5 meses y 3.6 ± 0.4 g/l vs 1.7 ± 0.2 g/l; $p < 0.001$ a los 10 meses). Se verificó glucosuria en el 100 % de las muestras de orina obtenidas a partir de los 3.5 meses de edad en los machos y de los 10-11 meses de edad en las hembras. Se comprobó además un aumento significativo de los valores de dichas curvas en relación con la edad. Existe diferencia significativa entre los machos de la línea eSS y eIIM con respecto al consumo medio diario de alimento (35.8 ± 1.6 g vs 27.3 ± 1 g; $p < 0.001$), de agua (32.9 ± 1.7 ml vs 25 ± 0.9 ml; $p < 0.001$) y de la diuresis de 24 h (12.9 ± 1.6 ml vs 6.1 ± 0.5 ml; $p < 0.001$). En ningún caso se observó obesidad. La intolerancia a la glucosa suele ser precoz y está presente en todos los animales eSS. En los machos de mayor edad es muy intensa a pesar de lo cual las glucemias de ayuno pueden ser normales y los animales permanecer libres de síntomas. Las manifestaciones clínicas son muy moderadas y no afectan el estado general ni provocan un acortamiento evidente de la vida. En los machos eSS se comprobó una reducción de la masa insular pancreática respecto de los testigos. Se verificó un número significativamente menor de islotes de Langerhans por campo microscópico de diámetro inferior a 3 ácinos pancreáticos (1.6 ± 0.9 vs 3.1 ± 0.8; $p < 0.001$) y de diámetro igual o superior a dicha medida (0.05 ± 0.2 vs 0.9 ± 0.4; $p < 0.01$). Es notable la similitud entre el síndrome de las ratas eSS y el MODY, diabetes humana diagnosticada en adolescentes y jóvenes, caracterizada por su benignidad clínica, por la ausencia de obesidad y de complicaciones y por una notable historia familiar de diabetes. En ambos síndromes el signo positivo más frecuente y que permite el diagnóstico es la intolerancia a la glucosa que suele ser de larga evolución y que se acompaña de una repercusión clínica mínima. Debe destacarse la ausencia de obesidad y la semejanza de los hallazgos de la anatomía patológica del páncreas. En conclusión el síndrome diabético de la línea eSS no se asemeja a las diabetes humanas clasificadas de acuerdo al patrón convencional de edad de comienzo, tal como sucede con otros síndromes diabéticos de roedores, pero sí puede servir de modelo a la diabetes humana del adulto de comienzo temprano.

177

Evidencias sobre la función inhibitoria de la glándula pineal en el desarrollo puberal de la rata hembra

María R. Faigón, D. P. Cardinali, J. Moguilevsky

Centro de Investigaciones Médicas Albert Einstein y Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), Buenos Aires

La pinealectomía (Px)altera el estado reproductivo de la mayoría de los verte-

brados, y entre los mamíferos, el de las especies sensibles a cambios en la iluminación ambiental. Si se somete a hamsters a privación de luz por lesión ocular o por exposición a fotoperíodos cortos (2-3 h de luz diarias) las gonadas involucionan en 8 a 10 semanas; en animales Px esta regresión no se produce, lo cual indica que el efecto del fotoperíodo sobre el eje neuroendocrino-gonadal es mediado por, o requiere, la presencia de hormonas pineales. Observaciones semejantes han sido hechas en la oveja, cabra, ciervo, hurón, liebre y ratón. Un momento particularmente sensible a la influencia pineal es la edad puberal. En el hombre se produce una depresión marcada de los niveles circulantes de la hormona pineal melatonina previa al aumento puberal de FSH. En la rata la Px adelanta la ovulación inducida por la inyección de suero de yegua preñada. El objetivo del presente estudio ha sido examinar los cambios producidos por la Px y melatonina en la aparición de la respuesta liberadora de LH ante la inyección de estradiol-progesterona (EP) en ratas hembras. Este fenómeno, central del proceso ovulatorio, se observa en animales normales desde los días 22º-24º. En un primer experimento grupos de 8-13 ratas fueron Px o sometidas a operación simulada en el día 10º y se las sacrificó a los 16, 18, 20 ó 22 días de vida; 3 días antes los animales recibieron 10 μg de E o vehículo s.c., y 5 h antes 1 mg de P s.c. (hora del sacrificio: 1700 h). La concentración de LH en plasma fue determinada por RIA. En el grupo de operación simulada y hasta el día 20 se observó una disminución de 32-63 % en LH plasmática luego de EP ($p < 0.05$), produciéndose en el día 22 la respuesta liberadora de LH (ng/ml, media ± ES) veh 20 ± 4, EP 828 ± 235 ($p < 0.01$). En el grupo Px sólo se observó la inhibición de la liberación de LH por estrógenos en el día 16 (veh 122 ± 46, EP 11 ± 1), desapareciendo dicha inhibición el día 18 (veh 13 ± 3, EP 12 ± 2) y observándose respuesta liberadora de LH el día 20, cuando aún los controles mostraron una respuesta de tipo inhibitorio (*Px:* veh 22 ± 4, EP 59 ± 11; *op. sim.* veh: 41 ± 10, EP 15 ± 2, $p < 0.05$). En el día 22 la liberación de LH producida por EP en ratas Px fue semejante a la del grupo control. En un segundo experimento se inyectó, a ratas hembra normales, melatonina (2, 10 o 50 μg diarios durante 10 días) y se las sacrificó el día 24. La respuesta liberadora de LH en los controles (veh 13 ± 1, EP 1205 ± 170) no se afectó por la dosis de 2 μg/día (veh 20 ± 4, EP 1375 ± 248) y fue inhibida tanto por la dosis de 10 μg (veh 24 ± 7, EP 456 ± 111) como por la de 50 μg (veh 25 ± 3, EP 428 ± 146). En un tercer experimento se estudió el efecto de la dosis diaria de 10 μg de melatonina durante 10 días sobre el desarrollo de la respuesta liberadora de LH por EP. La melatonina interfirió con el efecto de los esteroides a partir del día 18 con actividad máxima el día 24. *Conclusiones:* En la rata hembra la Px adelanta la maduración del mecanismo central ovulatorio. La inyección de melatonina modifica la liberación de LH por estímulo estrogénico durante el mismo período crítico (alrededor del día 20º).

178

Consideraciones sobre el tratamiento quirúrgico y médico del adenoma prolactínico

M. Janches, J. A. Andrada

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Buenos Aires

A pesar de la tendencia generalizada del tratamiento quirúrgico de los adenomas prolactínicos en los últimos años han aparecido opiniones divergentes con respecto a esta indicación terapéutica. En base a éstas presentamos 6 pacientes con microadenomas hipofisarios diagnosticados por politomografía de silla turca y cifras altas de prolactina en suero. Dos pacientes presentaban síndrome de amenorrea-galactorrea, una con amenorrea, otra con galactorrea y dos hombres con impotencia sexual. De dos pacientes en quienes se efectuó la adenoctomía por vía transepto

esfenoidal, se observó reaparición de las menstruaciones y normalización de la prolactinemia en una de ellas, pero después de 16 meses de la intervención las cifras de prolactina volvieron a aumentar a sus niveles preoperatorios, mostrando además una falta de respuesta a la TRH. En otra paciente, también operada, no se consiguió ningún efecto favorable en la reversión de la amenorrea-galactorrea ni en la normalización de la hiperprolactinemia. En esta paciente, el tratamiento con 5 mg de bromoergocriptina diarios normalizó su cuadro clínico, terminando el mismo en un embarazo. Dos pacientes que no fueron operadas lograron mejorar su cuadro clínico con bromoergocriptina terminando también una de ellas con un embarazo. El tratamiento médico, fue también administrado en los dos pacientes varones mejorando notablemente su potencia sexual. De acuerdo a estas observaciones la cirugía ha tenido resultados negativos en las dos pacientes operadas mientras que el tratamiento médico fue efectivo en todos los casos empleados, Dado que en la etiopatogenia del adenoma prolactínico no está aclarada si su origen es primitivamente hipofisario o secundario a una disfunción hipotalámica el tratamiento con bromoergocriptina es efectivo en cualquiera de las dos situaciones. La cirugía, por el contrario, necesitaría un diagnóstico diferencial preciso —difícil en la práctica diaria— para lograr una curación definitiva.

179

Exploración de la unidad hipotálamo hipofisaria en pacientes alcohólicos crónicos deteriorados abstinentes

R. Rozados, A. Guitelman, A. Goñi, Beatriz Espínola, L. Bokser, H. Dramicino

Hospital Militar Central, Hospital T. Alvarez e Instituto Nacional Neuropsiquiátrico J. T. Borda, Buenos Aires

El consumo crónico de alcohol produce efectos importantes sobre el sistema endocrino. Ha sido descripto el hipercortisolismo y cuadro clínico semejante a la enfermedad de Cushing en la intoxicación aguda, atribuyéndose al alcohol la responsabilidad directa de la alteración. Nuestro interés fue evaluar la función hipotálamo hipofisaria (H/H) en pacientes alcohólicos crónicos abstinentes ($\bar{x}$ 5 años) afectados de síndrome cerebral orgánico sin hepatopatía demostrable. Se estudiaron 11 pacientes del sexo masculino, cuyas edades oscilaron entre 44 y 68 años ($\bar{x}$ 57) libres de toda medicación durante 4 semanas previas a la evaluación, internados en el Servicio de Alcoholismo (Sala 5) del Inst. Neuropsiquiátrico J. T. Borda. La función hepática fue estudiada en todos por parámetros bioquímicos y en 5 de ellos con punción biopsia hepática. Se utilizó el test de Wechsler para determinar el grado de deterioro de la función psíquica. Todos los sujetos fueron sometidos a tomografía cerebral computarizada (T. C.) La capacidad de reserva hipofisaria en los sectores prolactínico somatotrófico y adrenal se evaluaron con la inyección iv de 200 μg de T.R.H., como estímulo del eje prolactínico, y 0.1 UI de insulina cristalina por kg de peso i.v. como estímulo de los ejes adrenal y somatotrófico. Todas las hormonas estudiadas se determinaron por radioinmunoanálisis. Los resultados obtenidos fueron: bioquímica de función hepática e histología normal. Los test psicométricos evidenciaron un deterioro psíquico del 14 % al 37 % con alteraciones de la memoria de evocación e inmediata, siendo la hipomnesia global el rasgo predominante. La T. C. mostró en todos los casos (11) marcada atrofia cerebral cortical y central, con ventrículos laterales moderada o severamente dilatados. El tercer ventrículo se encontró levemente dilatado y el cuarto normal. La respuesta prolactínica al T.R.H. fue $\bar{x}$ 429.2 % (respuesta en hombres normales $\bar{x}$ 245.38 %). Las medias para cada tiempo fueron: Basal: 11.1 ± 5.5; 30′ : 60.9 ± 376; 60′ : 41.0 ± 34; 90′ : 22.6 ± 16.0. Normales (nº = 10: Basal: 7.58 ± 1.58;

30′ : 18.6 ± 5.51; 60′ : 15.2 ± 4.83; 90′ : 13.4 ± 3.33). Los niveles basales de cortisol fueron normales, 181.4 ± 37.3, y el porcentaje de descenso a las 16 horas (ritmo circadiano) fue menor del 40 % (aceptado como normal). En cinco de los pacientes (45.45 %) no hubo respuesta en cortisol plasmático a la hipoglucemia insulínica, salvo en un paciente, a pesar de los signos clínicos y bioquímicos de hipoglucemia. La S.T.H. se elevó tardíamente (60′) en dos sujetos la respuesta fue nula. De los resultados se concluye que no puede imputarse sólo al efecto directo del alcohol las modificaciones hormonales, ya que las hemos observado en pacientes con abstinencia alcohólica prolongada. La normalidad de los valores basales de cortisol, prolactina y somatotrofina definirían una alteración de los mecanismos hormonales al *stress*, avalados además por la alteración del ritmo de cortisol, la ausencia de respuesta insulínica en el sector adrenal, y la retardada respuesta somatotrófica a la hipoglucemia insulínica. La mayor sensibilidad del lactropo al T.R.H. no excluye lo antedicho, ya que esta sustancia actúa directamente sobre la hipófisis, mientras que la hipoglucemia requiere la integridad de los mecanismos suprahipofisarios.

180

Estudio funcional del reflejo vestíbulo-espinal vertical (VEV) en el sapo, Bufo arenarum Hensel

A. M. Bronstein, S. B. Zanutto, A. Yorio, E. T. Segura

Laboratorio de Fisiología del Comportamiento, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

El análisis de las respuestas en frecuencia ha sido de gran utilidad en el estudio de los mecanismos de la función vestibular. Existe abundante biblografía respecto de los reflejos vestíbulo-oculares (especialmente en el plano horizontal). En cambio, y tal vez por las dificultades técnicas que supone trabajar con animales en completa libertad de movimiento, no se han publicado estudios de la respuesta en frecuencia del reflejo-espinal (VE). Considerando un modelo muy apropiado el sistema de control VE del sapo, se desarrolló una técnica de detección electromagnética de los movimientos cefálicos verticales en el sapo *Bufo arenarum* Hensel. Con este dispositivo se analizaron en forma continua las variaciones de amplitud y de fase del reflejo VEV en respuesta a una estimulación rotatoria sinusoidal de 50° de amplitud, con un rango de frecuencias entre 0.15 y 3 Hz, tanto en la luz (enfrentando los animales con una pantalla optoquinética fija) como en completa oscuridad. Se utilizaron animales machos normales de peso homogéneo. A frecuencias medias (1.5 Hz) no se observaron desplazamientos de fase de la respuesta respecto del estímulo. Por debajo de 0.2 Hz y por encima de 2.3 Hz tuvo lugar un retardo de fase de 10-15°. La ganancia del reflejo (amplitud de la respuesta/amplitud del estímulo) fue de 0.59 a 0.15 Hz, subió a 0.74 a frecuencias entre 0.2 y 0.4 Hz y luego decayó progresivamente hasta alcanzar un mínimo de 0.15 a 3 Hz. La entrada visual parece no jugar un papel compensatorio en estas respuestas VE para los valores de estimulación utilizados en este trabajo, ya que no se apreciaron diferencias significativas entre las observaciones realizadas en la luz o en la oscuridad. En conclusión, la técnica de análisis de sistemas aplicada en nuestros experimentos permite definir con gran precisión cuantitativa y gráficamente las relaciones funcionales entre estímulo y respuesta. Comparando nuestros resultados para el reflejo VEV en el sapo con los obtenidos en mamíferos para el reflejo vestíbulo-ocular se observa un comportamiento semejante sin desplazamiento de fase en frecuencias medianas y retraso en los rangos mayores. En cambio, para las frecuencias bajas los resultados difieren notablemente, pues el sapo presenta retraso de fase mientras que en mamíferos

se observa adelanto en el reflejo vestíbulo-ocular. Como los anuros carecen de movimientos oculares se sugiere que su forma de control define una adaptación particular que permite estudiar el reflejo VEV, en ausencia de respuestas vestíbulo-oculares.

181

Propiedades de los potenciales eléctricos a través de las membranas del tegumento del protoescolex de Echinococcus granulosus

Cristina Adriana Ibarra, I. L. Reisin

Departamento de Biofísica, Fundación CIMAE, Buenos Aires

El protoescolex (PE) del *Echinococcus granulosus* es un componente del estadío larval del parásito que se desarrolla a partir de la membrana germinativa de los quistes hidatídicos. Esta estructura tiene la propiedad de evolucionar, bajo adecuadas condiciones, hacia el estadío de tenia adulta o bien originar nuevos quistes hidatídicos. Esta última situación puede ocurrir cuando los PE se liberan en el huésped intermediario. El proceso por el cual un PE origina nuevos quistes hidatídicos va acompañado por profundos cambios en el contenido de agua y electrolitos y estos fenómenos son regulados, por lo menos en parte, por la presencia del tegumento, estructura celular sincicial que rodea y limita al PE. En esta comunicación analizaremos algunas propiedades de los potenciales eléctricos a través de las membranas del tegumento de protoescólices frescos o incubados in vitro, medidos mediante microelectrodos, con el fin de aclarar los posibles mecanismos que los originan. Los PE se obtienen de quistes hidatídicos ovinos y son lavados y resuspendidos en solución Ringer-Krebs (SRK). El procedimiento usado para la medición de los potenciales eléctricos (ΔV) consiste en suspender los PE en una cámara de plexiglass cuyo fondo posee un tejido monofilamento con orificios de 100 μm (Nitex). De esta manera los PE, que tienen diámetros entre 130 y 160 μm, quedan retenidos sobre la misma. Los PE se observan mediante un microscopio invertido (160X) y los registros se realizan mediante microelectrodos con resistencias de punta entre 15 y 25 MΩ que se conectan vía un preamplificador, a un osciloscopio y a un inscriptor gráfico. En algunas experiencias se utilizó un solo PE que fue manipulado mediante una micropipeta, lo que permitió analizar el efecto de las modificaciones de los baños de incubación en un mismo PE. Los PE ricos en Na se obtuvieron incubando PE en una solución Ringer-Krebs sin K^+ durante períodos de 16 a 20 horas a 4°C. La ouabaína cuando fue usada se la empleó en concentraciones de 10^{-4}M. La duración de los registros de los ΔV es habitualmente de pocos segundos por lo que se analizó la relación entre los valores de los ΔV y sus respectivas duraciones para intervalos entre menos de un segundo y más de 6 segundos, tanto para PE frescos como para los ricos en Na. Se observó que el valor del ΔV es independiente de la duración de los registros. Se pudo establecer entonces que en PE frescos existe un ΔV a través de las membranas del tegumento de -47.1 ± 0.8 mV (249) con referencia al baño externo. La ouabaína produce una significativa despolarización del ΔV a -32.7 ± 1.2 mV (85). Los ΔV de los PE ricos en Na, que en ausencia de K^+ externo tienen un valor de -32.0 ± 1.0 mV (9) se hiperpolarizan a -61.0 ± 1.1 mV (163) por la introducción de K^+ en el baño externo (5 mM). Esta hiperpolarización puede ser inhibida en gran medida por la presencia de ouabaína, que despolariza al ΔV a -41.0 ± 3.0 mV (171). La distribución de la población de los ΔV obtenidos en las condiciones precedentes fue analizada mediante histogramas, observándose que todas ellas tienen características monomodales con una sola población distinguible. El incremento de la concentración externa de K^+ produce, por encima de 10 mM, una progresiva despolarización del ΔV, lo que indicaría que el movimiento de K^+ a través de la barrera tegumentaria contribuye significativamente al ΔV. Concluimos que el ΔV que observamos a través de las membranas tegumentarias del PE tiene dos componen-

tes fundamentalmente distintos. Uno, sensible a la ouabaína, estimulado por pequeñas concentraciones de K^+ externo y puesto de manifiesto particularmente en los PE ricos en Na representaría el componente electrogénico de la bomba Na-K. El otro componente, sensible al K^+ externo, tiene propiedades compatibles con un mecanismo fundamentalmente difusivo.

182

Potenciación post-tetánica en músculo esquelético de rana

B. A. Kotsias, R. A. Venosa, P. Horowicz

Departamento de Biofísica, CIMAE, Buenos Aires; Instituto de Fisiología, Universidad Nacional de La Plata; Department of Physiology, The University of Rochester, Medical Center, Rochester, NY, USA

La estimulación tetánica de la fibra muscular rápida provoca un incremento transitorio de la respuesta mecánica simple: potenciación post-tetánica (PPT). El músculo desnervado presenta una serie de cambios eléctricos y mecánicos sin que hasta el presente se encuentre información acerca de la influencia del sistema nervioso sobre el desarrollo de la PPT. Se utilizaron músculos sartorio de rana (*R. pipiens*). Se registró la respuesta contráctil isométrica y los potenciales de acción al estímulo simple antes y después de un estímulo tetánico. El registro de la actividad eléctrica se realizó por el empleo de técnicas de registro intracelular. La primera derivada de la fase de despolarización y repolarización del potencial de acción fue concretada mediante diferenciación electrónica. La desnervación se logró por sección del nervio ciático. Los experimentos fueron realizados in vitro (20-23° C). 1) El potencial de membrana no es afectado por la desnervación. 2) Luego de la desnervación se observa un enlentecimiento de las fases de despolarización y repolarización del potencial de acción al estímulo simple. La sensibilidad de las fibras desnervadas a la tetrodotoxina, un bloqueante del canal de sodio voltaje dependiente, es similar a la de las fibras controles. 3) La PPT se incrementa significativamente en los músculos desnervados de forma tal que la respuesta mecánica post-tetánica no sólo es mayor que la pre-tetánica sino que también lo es respecto de la respuesta post-tetánica de las fibras controles. 4) Entre el 2-3 % de las fibras controles y desnervadas responden con actividad eléctrica repetitiva al estímulo simple luego del tétanos. 5) La duración del potencial de acción de las fibras desnervadas es significativamente prolongada luego de la estimulación tetánica por un enlentecimiento de las fases de despolarización y repolarización las que se normalizan en menos de diez minutos luego del cese del tétanos. Estos cambios son mucho menos marcados en las fibras controles. 6) Existe una relación temporal entre la duración del potencial de acción de las fibras desnervadas luego de la estimulación tetánica y la magnitud de la PPT. En conclusión: 1) La PPT es un fenómeno muscular ya que se presenta en las fibras desnervadas. 2) La PPT aumentada no se debe a una actividad repetitiva anómala luego del tétanos. 3) Este fenómeno se debería a una mayor concentración efectiva de iones calcio a nivel de las miofibrillas por un probable aumento en la liberación de dichos iones como consecuencia del alargamiento en la duración del potencial de acción. Esta sugerencia encuentra apoyo en otros datos experimentales: El efecto de los beta potenciadores (iones zinc, eserina) se debe a la prolongación del potencial de acción; la liberación de iones calcio desde el retículo sarcoplásmico hacia el mioplasma depende de la magnitud y duración de la despolarización.

183

Evolución de los cambios contráctiles desnervatorios en el músculo esquelético de rata

B. A. Kotsias, S. Muchnik

Departamento de Biofísica, Centro de Investigaciones Médicas A. Einstein e Instituto de Investigaciones Médicas, Buenos Aires

Continuando con nuestra línea de trabajo, en el músculo crónicamente desner-

vado quisimos estudiar las propiedades contráctiles en función del tiempo de la desnervación en músculos rápidos y lentos de rata. Algunos de los fenómenos estudiados no lo habían sido previamente y otros han sido descriptos con resultados contradictorios. Métodos: Se utilizaron 15 ratas Wistar empleándose músculos extensor digitorum longus (EDL, rápido) y sóleo (lento) en experimentos in vitro (34° C). Se estudió la respuesta contráctil isométrica con pulsos simples y dobles a distintas frecuencias de estimulación. Las contracturas fueron obtenidas con el agregado de cafeína (10-50 mM) a la solución salina. Los datos fueron expresados por unidad de peso. La desnervación se logró por sección del nervio ciático derecho siendo utilizados los músculos contralaterales del mismo animal como controles. Resultados: 1) la potenciación post-tetánica normalmente presente en los músculos EDL controles desaparece a los cuatro días de la desnervación; 2) aumento del período refractario del sarcolema en ambos músculos desnervados luego de dos días de la operación; 3) el tiempo necesario para producir la máxima tensión durante la contractura por cafeína es acortado significativamente en los músculos desnervados. La tensión desarrollada por el EDL desnervado se incrementa por un factor de dos respecto de la desarrollada por los controles mientras que la del músculo sóleo disminuye con la desnervación; 4) los músculos EDL desnervados por más de cuatro días no presentan la potenciación de la respuesta simple a la estimulación a baja frecuencia (fenómeno de la escalera). La respuesta del músculo sóleo no es afectada; 5) la respuesta mecánica simple del EDL desnervado aumenta con la desnervación mientras que la del sóleo disminuye durante los diez primeros días de la desnervación. La máxima velocidad de relajación disminuye en ambos músculos; 6) la máxima tensión tetánica disminuye en ambos músculos durante los diez primeros días de la desnervación. Este cambio va acompañado por un enlentecimiento de la velocidad de ascenso y de la de descenso de la respuesta tetánica. La tensión tetánica del músculo desnervado, especialmente la del sóleo decrece con el aumento en la frecuencia y duración del puso de estimulación. La elevación de la concentración de iones calcio en la solución salina (5 mM) produce una reducción de la tensión tetánica de los músculos desnervados siendo este cambio mucho menor en los músculos controles. Conclusiones: 1) el aumento en la tensión por estímulo simple y cafeína de los músculos EDL desnervados se debería a una mayor activación del aparato contráctil de la fibra; 2) la disminución de la tensión tetánica que se acrecienta con el aumento en la frecuencia de la estimulación podría basarse parcialmente en una falla en la conducción del impulso a nivel del sistema tubular, falla que se agravaría en presencia de alta concentración de calcio; 3) el aumento en la captación de iones calcio por el retículo sarcoplásmico del músculo desnervado con la disminución de la concentración efectiva de dicho ion a nivel de las miofibrillas sería la responsable de la falta de potenciación post-tetánica en los músculos EDL desnervados.

184

Efectos residuales sobre la excitabilidad de motoneuronas espinales alfa como consecuencia de la estimulación crónica del núcleo dentado en el hombre

A. Bronstein, R. E. P. Sica, Olga Paulina Sanz, J. Schvarcz

Sección de Electroneurofisiología Clínica, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires

Desde hace 2 años hemos empleado la estimulación crónica del núcleo dentado en el hombre con el objeto de reducir la espasticidad. La técnica de implantación de los electrodos y los efectos clínicos obtenidos han sido publicados separadamente (Schvarcz y col., 1979-1980). En 2 de los sujetos espásticos sometidos a este método hemos tenido oportunidad de seguir a lo largo del tiempo, los cambios producidos en la excitabilidad de las motoneuronas espinales alfa y de observar las variaciones agudas producidas sobre aquélla por efectos de la estimulación. Para ambos el régimen de esta última fue de 2 h con in-

tervalos de 3 h, manteniendo libre la noche. La estimulación fue hecha a 100 Hz con pulsos de 2 V de intensidad y de 0.25 min de duración. Los registros fueron obtenidos ipsilateralmente y, en ocasiones, el efecto contralateral fue igualmente estudiado. Los parámetros investigados fueron: *a)* la relación T/M en músculo sóleo, donde T es la expresión eléctrica del reflejo de estiramiento de los husos neuromusculares y M la que corresponde a la contracción sincrónica de todas las unidades motoras que integran el músculo; *b)* el coeficiente de excitabilidad de motoneurona en músculos de tenar ($z = Fr\text{-}Fv/M$), donde Fr es la expresión de la respuesta de la motoneurona por su estimulación antidrómica, Fv la de la misma neurona obtenida por su activación refleja, en tanto que M tiene la misma explicación que la dada arriba; *c)* el período de silencio eléctrico del electromiograma de músculos de tenar que se obtiene por la activación de las fibras cutáneas gruesas y de los husos de Golgi primariamente y por la pausa en la descarga de los husos neuromusculares secundariamente (S3), y *d)* la curva de recuperación de la excitabilidad de motoneuronas lograda por la aplicación de estímulos apareados sobre las fibras Ia provenientes de los husos neuromusculares del músculo sóleo. Los distintos registros fueron hechos en 5 oportunidades a lo largo de 209 días a partir del día 0 correspondiente a la implantación de los electrodos. Ipsilateralmente se observó que la relación T/M fue en progresiva reducción que llegó a ser del 30.22 % en el sujeto 1 y del 53.7 % en el 2. z varió en sentido inverso creciendo su valor en un 705.23 % en el sujeto 1 y en un 385.37 % en el 2. S3 varió de igual manera, siendo su incremento del 262 % en el sujeto 1 y del 123.53 % en el 2. En cuanto a la curva de recuperación de la excitabilidad, sus valores llegaron a estar dentro de 1 DS del valor normal en los registros finales. En relación a los efectos agudos se observó que la tendencia demostrada en el tiempo se hacía abruptamente más evidente durante o inmediatamente después de un período de estimulación. Los resultados obtenidos sugieren que la estimulación crónica del núcleo dentado induce cambios sostenidos y progresivos de la excitabilidad de las motoneuronas espinales alfa que, quizás, signifiquen la reordenación plástica de circuitos superiores que, finalmente, condicionan la capacidad de respuesta de las motoneuronas.

185

Variaciones con la edad de la respuesta refleja y directa de la motoneurona espinal alfa en el hombre

R. E. P. Sica, Olga Paulina Sanz

Sección de Electroneurofisiología Clínica, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires

Con el objeto de explorar el comportamiento a lo largo de la vida de los potenciales tardíos obtenidos por el estímulo eléctrico de un nervio dirigido a un músculo determinado, se investigaron las ondas F, H y T (F es la expresión muscular de la respuesta directa de la motoneurona alfa a su estímulo antidrómico, H es su respuesta frente al estímulo de las fibras Ia y T la que se obtiene por el estiramiento brusco de los husos neuromusculares) en un grupo de 58 sujetos normales de ambos sexos cuyas edades oscilaban entre 1 mes y 80 años. Para ello se estimuló el nervio cubital en muñeca y el nervio tibial posterior en hueco poplíteo, registrando con electrodos de superficie la actividad inducida en músculos de la eminencia hipotenar (Hp) y en sóleo (S), respectivamente. Tanto en uno como en otro músculo se cuantificó el número de unidades motoras funcionantes (n) observándose una progresiva disminución luego de los 60 años (r en Hp -0.53, $p < 0.001$; r en S -0.42, $p < 0.01$). De igual manera, se cuantificó el n que forman las ondas H, T y F, habiéndose hallado progresiva disminución en las dos primeras después de los 60 años (r para H -0.51, $p < 0.01$; r para T -0.34, $p < 0.05$) y ausencia de modificación para la última (r para F 0.04, p ns). En los susujetos que superaban la edad de 12 años se analizó la variación del tamaño de unidad motora (um) así como la frecuencia en la presentación de la onda F. Se observó que en Hp el tamaño de um se hacía mayor luego de los 60 años (r en Hp 0.55 $p < 0.001$) en tanto que no se modificó

mayormente en S (r en S 0.30, p ns). El porcentaje de presentación de la onda F varió entre el 89 y el 100 % para todas las edades después de los 12 años. En cuanto al ciclo de excitabilidad de las motoneuronas que inervan el S, no se observaron modificaciones de importancia a partir de la segunda década de la vida, estando su máxima recuperación entre los 200 y 250 ms luego del estímulo condicionante. Los hallazgos obtenidos sugieren que la población neuronal que responde al estímulo eléctrico del nervio de manera antidrómica (F) se mantiene indemne después de los 60 años y no integra el grupo neuronal que normalmente y de manera progresiva se hace no funcional luego de esa edad. Este último estaría constituido por células que tienen la posibilidad de responder de manera refleja pero no en forma antidrómica.

186

Tiempo de conducción sinoauricular en la rata, evaluado mediante estimulación en salvas, in vitro

J. Marcarian, J. C. Bastaroli, J. C. Bastaroli (h), J. Scaglione

Sección Cardiología, Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El tiempo de conducción sinoauricular (TCSA) puede determinarse por procedimientos directos e indirectos. Los primeros, mediante microelectrodos colocados dentro y fuera de las células marcapasos sinusal, o con un registro equivalente al potencial intracelular, comparando cronológicamente el electrograma auricular con un registro nodal obtenido por procedimientos diversos. Los métodos indirectos exigen conocer la pausa que sigue a: 1) un estímulo acoplado, 2) un estímulo precedido por salva y 3) a una salva; artificiales. En estas técnicas es necesaria la comprobación de la captura auricular por el ritmo marcapaseado. En este trabajo se combinó el empleo de una salva corta, con el del corazón *in situ* de un animal pequeño, prescindiéndose de la confirmación electrocardiográfica de la captura auricular, la que es inferida en cambio por la lentitud en la salida post-estimulación. De un número mayor de ensayos (descartados por trazado no interpretable, ausencia de pausa, etc.) se cuenta con 15 ratas blancas de 293 ± 18 gramos. Se efectúa anestesia con éter por inhalación, toracotomía y pericardiotomía. Se llena la cavidad torácica abierta, en parte de los experimentos, con Ringer-lactato a 30° C, aproximadamente. Se utiliza para los electrocardiogramas un polígrafo de Grass a chorro de tinta o un electrocardiógrafo común de inscripción directa, sobre papel termosensible. La estimulación consiste en aplicar nueve pulsos con un marcapasos programable Medtronic 5325. El ciclo artificial se programa en 200 mseg. La salva se repite nueve veces con intervalos de seis segundos. El TCSA se calcula restando a la pausa el ciclo basal y dividiendo por dos. El ciclo sinusal del corazón expuesto es 380 ± 26.5; el TCSA calculado con las primeras pausas de todos los animales es 155 ± 57.8 y el calculado con el total de estimulaciones de 215 ± 87.4 mseg. Estas cifras son más altas que las encontradas en el hombre. Se elevan en todos los casos confrontando en cada rata la medición primera y la última, pero los términos medios correspondientes al principio y al conjunto, no son significativamente diferentes entre sí. La preparación debe aumentar sus condiciones de estabilidad. Se concluye que es importante el poder asegurar la captura auricular y la descarga efectiva del nódulo sinusal, en base a la pausa en la salida post-estimulación. Gracias a lo cual, se hace aplicable a la experimentación animal, un método utilizado en clínica humana. Este método y hasta el directo llevan aparejados limitaciones e inconvenientes que le son inherentes y que todavía deben ser eliminados. De cualquier manera, la metodología presentada facilitará la realización de estudios en número suficiente y en forma relativamente sencilla, como para avanzar en la evaluación de fármacos y en la interpretación electrofisiológica relacionada al TCSA.

187

Permeabilidad al potasio en músculo denervado

R. A. Venosa, B. A. Kotsias

Cátedra de Fisiología con Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata y Centro de Investigaciones Médicas Albert Einstein, Buenos Aires

La denervación produce en músculo esquelético de rana una serie de cambios eléctricos y mecánicos probablemente debidos, al menos en parte, a alteraciones del transporte iónico. En esta serie de experimentos se investigó el efecto de la denervación sobre la permeabilidad al K (P_K) en músculo sartorio de rana. En músculos normales P_K tiene las características de un rectificador. Cuando la fuerza impulsora (FI) sobre K (diferencia entre el potencial de membrana y el potencial de equilibrio del ión: (V_m-E_K)) está dirigida de adentro hacia afuera de la fibra muscular, P_K es significativamente menor que en el caso de una FI del mismo valor absoluto y sentido opuesto (Katz, B.: *Arch Sci Physiol* 3: 285, 1949). A esta propiedad de P_K se la denomina "rectificación anómala" o más correctamente "rectificación hacia adentro." Cuando mayor es la FI hacia afuera, menor es P_K (Hodgkin, A. L. y Horowicz, P., *J Physiol* 148: 127, 1959). La composición del Ringer normal fue la siguiente (mM/l) : NaCl, 115; KCl, 2.5; $CaCl_2$ 1.8; Na_2HPO_4, 2.15; NaH_2PO_4, 0.15; pH : 7.2. La composición del Ringer 100-K fue la misma excepto que $(K)_o$ = 100 m M/l y $(Cl)_o$ = 219 mM/l. V_m se determinó mediante técnicas convencionales con microelectrodos de vidrio y el eflujo de K usando ^{42}K. La denervación se efectuó mediante la sección de uno de los nervios ciáticos cerca de su salida de la médula. En todos los experimentos se utilizaron pares de músculos aislados (denervado y control) provenientes del mismo animal. El V_m en músculos normales de rana es del orden de − 90 mV. Cuando se los equilibra por 2-3 h en Ringer 100 - K, $V_m = E_K = ECl \cong -20$ mV. Si en estas condiciones $(K)_o$ se reduce a 2.5 mM/l (reemplazando K por una cantidad equivalente de Na) E_K pasa de − 20 a − 113 mV mientras que E_{Cl} no se altera. En principio V_m debería tender hacia un valor intermedio entre E_K y E_{Cl} (− 66 mM) pero debido a la considerable FI hacia afuera ejercida sobre K (− 66 - (− 113) = 47 mV) P_K se reduce (rectificación) haciéndose despreciable respecto de P_{Cl} y por lo tanto V_m es completamente determinado por E_{Cl} = − 20 mV, permaneciendo en ese valor por varias horas. En condiciones similares los músculos denervados, por el contrario, no se mantuvieron despolarizados sino que repolarizaron llegando a un V_m de − 90 mV en 2-3 h. Los resultados de las mediciones de eflujo de K realizadas en condiciones idénticas a las usadas en las determinaciones de V_m fueron consistentes con éstas. Cuando se aplicó un FI hacia afuera haciendo V_m positivo [$(Cl)_o$ de 219 a 0 mM/l] el eflujo de K se redujo en 33.6 ± 6.0 % (ES) en músculos denervados 35 y 60 días antes, mientras que en los controles homólogos la reducción fue de 64.2 ± 3.1 %. También el tiempo medio ($t_{0.5}$) para completar la reducción fue mayor en los denervados (11.6 ± 0.6 min) que en los controles (3.4 ± 0.6 min). El bloqueo del canal rectificador de K mediante el reemplazo de K por Rb en el medio externo (Adrian, R H.: *J Physiol* 175: 135, 1964) reveló que en presencia de una FI hacia afuera la P_K remanente era considerablemente mayor en músculos denervados que en los controles. Estos datos sugieren que la disminución de las propiedades rectificadoras de la P_K producida por denervación sería el resultado del pasaje de K por un canal rectificador defectuoso y/o del aumento de la conductancia a este ión de un canal lineal, como consecuencia posiblemente, de la supresión de algún factor trófico neural.

188

Efecto comparativo del glutamato de arginina y el ácido gama amino butírico (GABA) en ratones expuestos a dosis tóxicas de oxígeno hiperbárico (OHB)

R. R. Pittaluga, J. A. Andrada, G. Spirito

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Buenos Aires

Las convulsiones son un signo característico de la neurotoxicidad del oxígeno.

Habría una relación inversa entre los niveles de GABA cerebral y la sensibilidad a la acción convulsivante del OHB. Anteriormente demostramos la eficacia de un metabolito del GABA, el ácido gama amino beta hidroxi-butírico, en la prevención de dicho efecto, en ratones. El glutamato es un precursor del GABA en el SNC y su rol como probable neurotransmisor aún discutido. Es motivo de este trabajo evaluar la acción del glutamato de arginina (GA) en ratones BALB expuestos a dosis tóxicas de OHB, en comparación con grupos control y tratados con GABA. Se emplearon 64 ratones BALB, machos, peso medio 27.5 $\pm$ 2.5 g, distribuidos en 7 lotes: A (n = 16) (control); B, C y D (n = 8 c/u) tratados respectivamente con 0.1, 1 y 10 g/kg de peso de una solución de GA, por vía intraperitoneal, 15-20 minutos antes de comenzar la exposición a OHB, y E, F y G (n = 8 c/u) medicados con iguales dosis de GABA y en idénticas condiciones. Todos los animales fueron alimentados con Forramex y agua *ad libitum* y expuestos de 2 o 3 por jaula y por vez, en una cámara hiperbárica de 15 l de capacidad, a la respiración de O_2 a 4 atmósferas absolutas de presión durante 180 minutos; la temperatura fue de 22 $\pm$ 2° C y la humedad del 60 $\pm$ 20 %. Se evaluaron: el período de latencia (PdL) y el grado de protección (GdP) y la sobrevida a las 48 h. Resultados: Todos los grupos presentaron un PdL superior al del control ($p < 0.05$ a < 0.005) aunque en el C (GA, 1 g/kg) esta diferencia no fue significativa ($p < 0.10$). El GdP alcanzado con GA fue semejante al logrado con dosis equivalentes de GABA, salvo en el grupo C (GA, 1 g/kg) que fue significativamente menor ($p < 0.05$) que en el F (GABA, 1 g/kg). El lote que recibió GABA a razón de 10 g/kg tuvo una mortalidad inmediata del 50 %; aún así, los animales sobrevivientes a estas dosis presentaron una protección óptima contra el OHB. La mejor sobrevida se obtuvo con las dosis más altas de cada droga. Conclusiones: 1) El glutamato de arginina es eficaz en la prevención de las convulsiones inducidas por el OHB en ratones BALB, machos, y relativamente más inocua que el GABA. 2) El efecto del glutamato de arginina es semejante, aunque algo menor en valores absolutos al logrado con iguales dosis de GABA. 3) Una mejoría importante en la sobrevida fue sólo observada en los grupos pretratados con muy altas dosis de GABA o glutamato de arginina. Nos queda por determinar si la acción protectora del glutamato de arginina es propia de uno o ambos de sus componentes y/o si además es compartida por otros glutamatos.

189

Inhibición de los receptores para C_3 y eritrocitos de carnero inducida por antibióticos

Patricia Nualart, María E. Estevez, Luisa Sen, R. Diez

Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Los antibióticos se usan para conservar reactivos biológicos, y en los cultivos de células in vitro. El propósito del trabajo fue determinar la influencia de los antibióticos en relación con receptores de membrana linfocitarios a través de la formación de rosetas adicionándolos en distintas concentraciones a los reactivos o a los linfocitos. Las células mononucleares de sangre venosa periférica defibrinada de 23 dadores normales se separaron por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque. Se estudió la formación de rosetas E 4° C y EAC. Los antibióticos empleados fueron: 1) gentamicina (G), aminoglucósido que inhibe la etapa inicial de síntesis proteica en bacterias, 2) demetilclortetraciclina clorhidrato (DMCT), antibiótico de amplio espectro que también interfiere la síntesis proteica en bacterias y en células de mamíferos, y 3) ampicilina trihidrato (A), que se acepta actúa sobre la pared bacteriana, sin acción sobre la membrana de células eucarióticas. Los porcentajes normales para rosetas E 4° C fueron $\bar{x} \pm$ DS) 52.5 $\pm$ 8.9 y para EAC 23.8 $\pm$ 5. Adicionando a los reactivos distintas concentra-

ciones de G (30, 42.5, 85 y 170 μg/ml) hubo una reducción de las rosetas formadas proporcional a la dosis de G empleada. En la concentración de 85 μg/ml se observó inhibición significativa con respecto a los controles, siendo los valores para E 4° C de 31 ± 3.8 y para EAC 12.3 ± 3.5 ($p < 0.001$). Para probar si el antibiótico afectaba los receptores de los linfocitos, las células se incubaron con G a distintas concentraciones y tiempos (15, 30 v 60 minutos), se lavaron y luego se determinó la formación de rosetas. A los 30 minutos los porcentajes de E 4° C y EAC fueron 35.7 ± 8.2 y 12.6 ± 2.7, respectivamente, evidenciándose inhibición significativa ($p < 0.001$ en ambos) como también a los 60 minutos. La disminución de rosetas proporcional a la concentración de G utilizada fue significativa a 85 μg/ml para rosetas E 4° C: 29.8 ± 5.6 ($p < 0.001$) y a 42.5 μg/ml para EAC: 12.3 ± 2.7 ($p < 0.005$). En consecuencia, los receptores para C_3 de los linfocitos son afectados a concentraciones menores de G que los receptores para eritrocitos de carnero (E). Es importante destacar que 85 μg/ml es la concentración empleada en el mantenimiento de líneas celulares in vitro. Se estudió, además, el efecto de DMCT y A, y al elegir las concentraciones se tuvo en cuenta como parámetro de comparación la concentración de G que produce inhibición manifiesta de la formación de rosetas, que equivale a 6 veces la concentración inhibitoria mínima. Con DMCT agregada a los E el porcentaje de E 4° C fue de 47 ± 9.5, de modo que la reducción no fue significativa, mientras que sí lo fue para rosetas EAC :17.9 ± 2.9 ($p < 0.005$). Al incubar las células con DMCT fueron necesarios 30 minutos para inhibir las rosetas E 4° C, cuyos valores fueron 39.9 ± 8.7 ($p < 0.001$) y 15 minutos para rosetas EAC, con un porcentaje de 17.6 ± 4.3 ($p < 0.01$). Esto demuestra que el receptor para C_3 es más sensible a la acción de DMCT que el receptor para E. No se detectó efecto potenciador cuando a las células incubadas con DMCT se le adicionaron E que contenían G en concentración no inhibitoria, ya que si bien los porcentajes de rosetas E 4° C: 45.8 ± 6.7 y EAC: 17.1 ± 3.3 indicaron que la disminución fue significativa ($p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente), no lo fue en mayor grado que cuando los E no contenían G. Por su modo de acción G y DMCT parecerían influir en la síntesis proteica que alteraría los receptores del linfocito. Para comprobarlo se seleccionó como tercer antibiótico A. Los resultados fueron semejantes a los hallados con DMCT. Cuando se agregó A a los E no hubo reducción significativa de rosetas E 4° C, cuyo porcentaje fue 44.9 ± 10.6; aunque sí se vio para rosetas EAG, ya que el valor fue 18.9 ± 2.5 ($p < 0.001$). El tiempo de incubación de las células con A necesario para inhibir las rosetas E 4° C fue de 30 minutos, con un porcentaje de 40 ± 8.3 ($p < 0.001$), y para las EAC fue de 15 minutos, con un valor de 17.3 ± 3.3 ($p < 0.005$). Tampoco se detectó en este caso efecto potenciador. Es poco probable que la A actúe sobre la síntesis proteica de los linfocitos; es factible que su acción se deba al bloqueo de los receptores o podría interferir con el complemento. Este trabajo demuestra que los antibióticos G, DMCT y A cuando se utilizan a concentraciones equivalentes a dosis terapéuticas in vitro, inhiben parcialmente la formación de rosetas E 4° C y EAC.

190

Actividad quimiotáctica del N-formil-L-metionil-L-fenilalanina (FMLP) y del suero activado con zymosan (SAZ) sobre polimorfonucleares (PMN) humanos

Alicia N. Stein, María E. Estevez, Luisa Sen, R. A. Diez

Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

La quimiotaxis es un proceso por el cual determinadas sustancias (factores quimiotácticos) provocan la migración celular dirigida hacia la fuente de un gradiente de concentración y es éste el proceso por el cual estas células se dirigen hacia los focos de inflamación, siendo una función de defensa muy importante. La finalidad de este estudio fue evaluar la capacidad de respuesta quimiotáctica de PMN frente a distintos factores quimiotácticos o a una

misma sustancia en variadas condiciones experimentales. Se emplearon PMN de sangre periférica de 14 sujetos normales separados por gradiente de Ficoll-Hypaque y posterior sedimentación con Dextrán. Se utilizó la técnica de migración celular bajo capa de agarosa: se colocó el medio de agarosa líquido, caliente, al 0.75 %, sobre portaobjetos, y se lo dejó solidificar, luego de lo cual se perforaron en la agarosa cinco series de tres orificios de 2.5 mm de diámetro cada uno. La suspensión celular se colocó en el orificio central. En uno de los orificios externos, perforado a una distancia de 2.5 mm del orificio de siembra, se colocó el control, solución salina balanceada de Hanks (HBSS) y en el otro, el factor quimiotáctico, a una distancia de 2.5 mm o 4.5 mm. Los portaobjetos se incubaron durante tres horas a 37° C, en un ambiente húmedo con 5 % de CO_2, luego de lo cual se fijaron con metanol anhidro y se colorearon con Giemsa diluido. La distancia de migración celular se cuantificó por examen al microscopio óptico utilizando un micrómetro ocular calibrado. Las distancias migratorias respectivas hacia el factor quimiotáctico (MD: migración dirigida) o hacia el control (ME: migración espontánea) se definieron como la distancia desde el borde del orificio central hasta el punto más lejano en el que se encontraron dos células al borde del orificio. Se utilizaron como factores quimiotácticos SAZ (50 mg zymosán/ml de suero) y FMLP diluido en HESS (1, 0.5, 4.2, 0.1 y 0.05 mg FMLP/ml HBSS). La migración celular espontánea fue independiente del factor quimiotáctico y de las condiciones experimentales y significativamente menor que la MD ($p < 0.001$): ME: 394.54 ± 157.78 μ ($\bar{x}$ ± DS). El SAZ se colocó a 2.5 mm de distancia de las células y el frente de migración celular dirigida formó un ángulo agudo bien definido y el área de migración fue angosta. La MD fue de 1119.5 ± 326.44 μ. Con FMLP a 2.5 mm el frente de migración dirigida fue ancho y romo, siendo la MD: 972.82 ± 162.79 μ, menor que la MD frente a la SAZ. Esta diferencia podría deberse a la mayor velocidad de difusión del FMLP con respecto al SAZ, dado su menor PM. Así, luego de la incubación, el FMLP ubicado a 2.5 mm podría haber difundido algo más allá del borde del orificio de siembra, aumentando la migración celular de un área de células más ancha. Las sustancias quimiotácticas presentes en el SAZ, de mayor PM, difundirían una menor distancia en el tiempo de incubación. Se efectuaron experiencias en las que el FMLP se colocó a 4.5 mm del orificio central de forma tal que el frente de difusión no sobrepasara el borde de este orificio. Se obtuvieron frentes de migración dirigida más agudos y áreas más angostas, siendo la MD: 1338.27 ± 331.55 μ, significativamente mayor que la obtenida con FMLP a 2.5 mm ($p < 0.01$) y sin diferencia significativa con la MD obtenida con el SAZ. La respuesta quimiotáctica de PMN frente a distintas concentraciones de FMLP a 4.5 mm, fue: MD: para 1 mg/ml 769.87 ± 234.03 μ; 0.5 mg/ml: 1309.46 ± 590.17 μ; 0.2 mg/ml: 1403.03 ± 315.43 μ; 0.1 mg/ml: 1323.88 ± 162.8 μ, y 0.05 mg/ml: 730.31 ± 76.33 μ. En estos experimentos preliminares la MD resultó ser mayor frente a concentraciones de 0.5, 0.2 y 0.1 mg/ml que frente a 1 ó 0.05 mg/ml. Este estudio demuestra la gran importancia de tener en cuenta las características fisicoquímicas de la sustancia quimiotáctica utilizada, así como su concentración, en la elección de las condiciones experimentales necesarias para evaluar adecuadamente la capacidad de migración celular.

191

Prevención de orquitis experimental autoinmune en ratón por partículas de diatomeas

O. D. Bustuoabad, J. A. Genovese, Christiane Dosne Pasqualini

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Se conoce que altas dosis de sílica, inoculadas por vía endovenosa o intraperitoneal en ratones Swiss, ejercen un efecto facilitador sobre el crecimiento tumoral o el desarrollo de enfermedades virales. Por otra parte, la inoculación de antígenos combinados con bajas dosis de diatomeas poseen

un efecto adyuvante sobre la producción de anticuerpos. En este trabajo se utilizaron inoculaciones reiteradas de bajas dosis de partículas de diatomeas, con el objeto de estudiar su efecto sobre el desarrollo de una orquitis experimental autoinmune, en ratones Swiss, inducida por sensibilización con antígeno testicular homólogo, emulsionado en Freund completo. Se constituyeron 2 grupos experimentales: el primero fue sensibilizado en dos oportunidades, días 0 y 14, con 40 mg de antígeno testicular homólogo, emulsionado en 0.2 cc de adyuvante de Freund completo (Difco), por vía intradérmica en dos sitios del dorso. El grupo 2 fue sensibilizado de igual forma, y tratado con 0.002 mg de partículas de diatomeas en suspensión, por vía intraperitoneal, 7 días antes del primer desafío, y cada 4 días a partir del mismo, hasta el día 30. En el día 45 los animales fueron sacrificados y los testículos procesados para microscopía óptica. El grupo no tratado presentaba lesiones testiculares compatibles con orquitis grado 3 ó 4 (según la clasificación de Freund) en un 55 % (20/36), de los animales. El grupo tratado con diatomeas presentaba lesiones 1 y 2 en el 22 % (8/36) de los casos. Estos resultados indican que la inoculación reiterada de bajas concentraciones de diatomeas interfiere en el desarrollo de una orquitis experimental autoinmune del ratón. Se postula que esta interferencia estaría determinada por la estimulación de los macrófagos que producen un secuestro del antígeno testicular inoculado, con la resultante disminución de la lesión autoinmune.

192

Efecto del acetato de medroxiprogesterona sobre el crecimiento de un fibrosarcoma murino

CLAUDIA LANARI, CHRISTIANE DOSNE PASQUALINI

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Se sabe que la progesterona tiene un efecto citolítico sobre fibroblastos embrionarios in vitro a una concentración de 1.4 x 10^{-3} M; además, pacientes con fibromatosis fueron tratados satisfactoriamente con la misma. El objeto de este trabajo fue estudiar el efecto del acetato de medroxiprogesterona sobre el crecimiento de un fibrosarcoma murino. Dicho fibrosarcoma se originó nueve meses después de la implantación de un cilindro de vidrio debajo de la piel de un ratón de la cepa BALB/c por un fenómeno conocido como tumorigénesis a cuerpo extraño y se mantiene por pasajes seriados en la cepa de origen. Se inocularon 36 ratones BALB/c hembras de 2 meses de edad con células de dicho fibrosarcoma mediante trócar por vía subcutánea junto con: *a*) 1 ml de solución fisiológica, o *b*) 1 ml (50 mg) de acetato de medroxiprogesterona, Depo-Provera de Upjohn. Los parámetros observados fueron: crecimiento tumoral —medido con un calibre (2 medidas: ancho y largo)—, mortalidad y tiempo de sobrevida. El tamaño tumoral 8 días después de la inoculación fue en el grupo *a*) 75 ± 8 mm² y en el *b*) 69 ± 8 mm², no existiendo diferencias significativas entre ambos grupos. Después de 90 días de observación la mortalidad fue en el grupo *a*) del 100 % (18/18) y en el grupo *b*) del 72 % (13/18), permaneciendo el resto de los animales en buenas condiciones y libres de tumor. El tiempo de sobrevida en el grupo *a*) fue de 26 ± 2 días y en el *b*), considerando solamente aquellos animales que murieron, de 38 ± 2 días ($p < 0.001$). Con el objeto de investigar los posibles efectos que pudieran provenir del excipiente en el cual está vehiculizado el acetato de medroxiprogesterona, se repitió el experimento, añadiendo este control. Ratones BALB/c machos fueron inoculados de la misma manera que en el experimento anterior junto con: *a*) 1 ml de solución fisiológica: *b*) 1 ml del excipiente (polietilenglicol 4000, 28.8 mg/ml; polisorbato 80, 1.92 mg/ml; cloruro de sodio, 8.65 mg/ml; metilparabeno, 1.73 mg/ml y propilparabeno 0, 19 mg/ml), y *c*) 1 ml (50 mg) de acetato de medroxiprogesterona. El tamaño tumoral a los 8 días fue: *a*) 62 ± 26 mm² ($n = 5$); *b*) 221 ± 22 mm²)n = 10), y *c*) 90 ± 18 mm² ($n = 11$). Las diferencias fueron significativas entre los grupos *a*) y *b*) ($p < 0.001$)

y entre *b*) y *c*) ($p < 0.001$), no habiendo diferencia significativa entre *a*) y *c*) al igual que en el experimento anterior. A los 15 días las diferencias entre los grupos se mantuvieron con los mismos grados de significación: *a*) 265 ± 37 mm^2, *b*) 577 ± 56 mm^2 y *c*) 144 ± 43 mm^2. A los 70 días de observación la mortalidad en el grupo *a*) fue del 100 % (5/5), en el *b*) 100 % (10/10) y en el *c*) 36.4 % (4/11) ($p < 0.01$). El tiempo de sobrevida en el grupo *a*) fue de 35 ± 4 días, en el grupo *b*) 29 ± 2 días y en el *c*), considerando solamente los animales que murieron, fue de 45 ± 6 días ($p < 0.01$). El transplante subcutáneo del fibrosarcoma singeneico utilizado produce siempre un 100 % de mortalidad en los miembros de la cepa BALB/c. Los resultados obtenidos muestran que la administración local del acetato de medroxiprogesterona Depo-Provera reduce significativamente ($p < 0.01$) la mortalidad por crecimiento tumoral, si bien inicialmente el tumor parecería crecer en todos los grupos. Aquellos animales que mueren a causa de la toma tumoral en el grupo tratado con acetato de medroxiprogesterona sobreviven significativamente más tiempo que los controles.

193

Daño fetal en el ratón por pretratamiento de la madre con antígenos no paternos

Daniel Reznik, Isabel Piazzon
Christiane Dosne Pasqualini

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Es conocido el hecho de que aunque resulta difícil dañar al feto por inmunización de la madre con antígenos paternos, en condiciones especiales es posible lograrlo. En trabajos anteriores indujimos daño fetal por pretratamiento de la madre con antígenos paternos normales y neoplásicos. El daño fetal es causado por reacciones de injerto contra huésped provocadas por el pasaje transplacentario de linfocitos T alorreactivos maternos, los que desencadenan el ataque citotóxico hacia los antígenos de histocompatibilidad paternos expresados en el feto. El objeto de este trabajo consistió en determinar si era posible inducir daño fetal por pretratamiento con un antígeno convencional no relacionado con la cepa paterna. Se inmunizaron semanalmente hembras de la cepa BALB/c con glóbulos rojos de carnero (GRC) 0.2 ml de GRC al 10 % intraperitoneal hasta completar 4, 8 y 12 dosis. También se inmunizaron hembras de la cepa Swiss –cepa de exocría– con 1, 4 y 8 dosis siguiendo el mismo esquema de inmunización. 4 días después de la última dosis, las hembras BALB se aparearon con machos de las cepas Swiss ($H\text{-}2^s$), DBA/2 ($H\text{-}2^d$), o BALB ($H\text{-}2^d$). Las hembras Swiss se aparearon con machos AKR ($H\text{-}2^k$). Se observaron los siguientes parámetros: % de daño fetal al destete o runting (R), determinado por el número de muertes desde el nacimiento hasta el destete; % de abortos (A) y % de muerte total, dato que incluye las muertes producidas por runting y por abortos (MT). Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Preñez BALB ♀ x Swiss ♂: 0 dosis: R, 19/108 (17 %); A, 4/14 (0 %); MT, 19/108 (17 %). 4 dosis: R, 3/59 (5 %); A, 7/16 (44 %) ($p < 0.01$); MT, 45/101 (44 %) ($p < 0.001$). 8 dosis: R, 10/63 (16 %); A, 1/10 (10 %); MT, 19/69 (23 %). 12 dosis: R, 9/64 (14 %); A, 1/11 (9.9 %); MT, 15/70 (21 %). Preñez BALB ♀ x DBA/2 ♂: 0 dosis: R, 9/134 (7 %); A, 1/16 (6 %); MT, 17/142 (12 %). 4 dosis: R, 5/100 (5 %); A, 0/14 (0 %); MT, 5/100 (5 %). 8 dosis: R, 4/82 (5 %); A, 1/11 (9.9 %); MT, 12/90 (13 %). 12 dosis: R, 10/124 (8 %); A, 1/17 (6 %); MT 18/132 (14 %). Preñez BALB ♀ x BALB ♂: 0 dosis: R, 7/89 (8 %); A, 1/14 (7 %); MT, 13/95 (14 %). 4 dosis: R, 13/91 (14 %); A, 0/18 (0 %); MT, 13/91 (14 %). 8 dosis: R, 5/24 (20 %); A, 0/4 (0 %): MT, 5/24 (20 %). 12 dosis: R, 5/68 (7 %); A, 3/14 (21 %); MT, 23/86 (27 %) ($p < 0.05$). Preñez Swiss ♀ y AKR ♂: 0 dosis: R, 2/46 (4.3 %); A, 0/7 (0 %); MT, 2/46 (4.3 %). 1 dosis: R, 1/19 (5.2 %); A, 0/6 (0 %); MT, 1/19 (5.2 %). 4 dosis: R, 2/44 (4.5 %); A, 2/5 (40 %); MT, 14/56 (25 %) ($p < 0.01$). 8 dosis: ninguna de las 12 hembras quedó preñada durante el período de observación (2 meses), a pesar de haber

cambiado los machos. Como se observa, la inoculación de GRC indujo daño fetal significativo dependiente de la dosis, en combinaciones que involucran diferencias a nivel de H-2; ninguna de las dosis usadas indujo daño en preñeces que involucran sólo diferencias a nivel de antígenos menores de histocompatibilidad. En la combinación singeneica, se detectó daño fetal al inocularse la dosis mayor —12 dosis—, lo que sugiere la presencia de reacciones autoinmunes. Los resultados obtenidos pueden deberse a: 1) una profunda alteración en el tráfico linfoide de linfocitos T aloreactivos, con ciertas dosis de GRC; 2) la presencia de receptores para antígenos convencionales en los linfocitos T alorreactivos, induciéndose en esta forma un aumento en la frecuencia de los mismos por estimulación con determinadas dosis del antígeno convencional. En el trabajo siguiente, se discuten estas dos alternativas.

194

Receptores para antígenos convencionales en linfocitos T alorreactivos

Isabel Piazzon, Adriana Déroche, Marta Matusevich, Christiane Dosne Pasqualini

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Con el objeto de investigar si los linfocitos T alorreactivos —aquellos que reaccionan contra antígenos mayores de histocompatibilidad no propios— poseen también receptores para antígenos convencionales, ratones de la cepa BALB/c fueron inoculados repetidamente con glóbulos rojos de conejo (GRCo). El parámetro usado para medir la alorreactividad T fue la capacidad que presentaban estos animales de montar reacciones de injerto contra huésped (IcH). Se utilizaron el ensayo local de Ford y Simonsen y el de Simonsen para recién nacidos. Ratones BALB de 2 meses de edad fueron inoculados semanalmente con dosis de 0.2 ml de una suspensión de GRCo al 10 % por vía ip. Los esplenocitos de estos animales fueron utilizados para desencadenar reacciones de IcH en: 1) Fl (BALB x AKR) adultos ($H\text{-}2^d$ x $H\text{-}2^k$), obteniéndose los siguientes resultados: control normal (0 dosis GRCo): 2.36 ± 0.38 mg (n = 9); 4 dosis GRCo: 6.52 ± 0.45 mg (n = 6) ($p < 0.001$); 5 dosis GRCo: 7.54 ± 0.51 mg (n = 7) ($p < 0.001$); 6 dosis GRCo: 6.60 ± 0.45 mg (n = 17) ($p < 0.001$); 10 dosis GRCo: 2.54 ± 0.34 mg (n = 8) (S). 2) Swiss recién nacidos ($H\text{-}2^s$): los resultados se expresan como la relación entre el peso del bazo 10 días después de la inoculación y el peso corporal, multiplicado por 10^3. Control normal (0 dosis GRCo): 4.58 ± 0.36 (n = 9); 4 dosis GRCo: 10.15 ± 0.71 (n = 7) ($p < 0.001$); 6 dosis GRCo: 4.86 ± 0.31 (n = 11) (NS); 10 dosis GRCo: 5.13 ± 0.46 (n = 8) (NS). 3) Fl (BALB x DBA/2) adultos ($H\text{-}2^d$ x $H\text{-}2^d$): control normal (0 dosis GRCo): 0.15 ± 0.09 mg (n = 15); 5 dosis GRCo: 0.15 ± 0.07 mg (NS); 7 dosis: 0.26 ± 0.10 mg (n = 9) (NS); 10 dosis GRCo: 0.20 ± 0.08 mg (n = 8) (NS). 4) Fl (BALB x C57B1/Ks) adultos ($H\text{-}2^d$ x $H\text{-}2^d$): control normal (0 dosis GRCo): –0.08 ± 0.16 (n = 14); 4 dosis GRCo: 0.14 ± 0.17 mg (n = 7) (NS); 6 dosis GRCo: 0.08 ± 0.09 mg (n = 8) (NS); 10 dosis GRCo: 0.01 ± 0.08 mg (n = 10) (NS). Se realizó luego el siguiente experimento: se inocularon por vía iv ratones F1 (BALB x AKR) adultos con 0.2 ml de suero F1 (BALB x AKR) anti-idiotipo BALB anti GRCo o con 0.2 ml de suero F1 (BALB x AKR) normal. Un día más tarde, se desencadenaron en los mismos, reacciones de IcH locales, inoculándoles: esplenocitos BALB normales; esplenocitos BALB 6 dosis GRCo o esplenocitos BALB inmunes a AKR. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: suero F1 normal + esplenocitos BALB normales (0 dosis): 2.18 ± 0.27 mg (n = 10); suero F1 normal + esplenocitos BALB 6 dosis GRCo: 6.6 ± 0.45 mg (n = 17); suero F1 anti-idiotipo anti GRCo + esplenocitos BALB 6 dosis GRCo: 3.30 ± 0.40 mg (n = 9); suero F1 anti-idiotipo anti GRCo + esplenocitos BALB normales (0 dosis GRCo): 2.21 ± 0.25 mg (n = 6); suero F1 normal + esplenocitos BALB inmunes a AKR: 6.08 ± 0.56 mg (n = 12); suero F1 anti-idiotipo anti GRCo + esplenocitos BALB inmunes a

AKR: 5.89 ± 0.51 mg (n = 10). Los resultados obtenidos muestran que la inmunización con un antígeno convencional induce aumentos en el nivel de alorreactividad T esplénico anti $H\text{-}2^k$ y anti $H\text{-}2^s$, según la dosis de antígeno administrada, volviéndose luego a los niveles normales. El número de dosis de GRCo que induce la normalización de los niveles alorreactivos es diferente para cada uno de los H-2 examinados. No se detectaron cambios en alorreactividad T hacia antígenos menores de histocompatibilidad con ninguna de los dosis testeadas en los dos tipos de F1 ($H\text{-}2^d$ x $H\text{-}2^d$). El pretratamiento con un suero con actividad anti-idiotípica anti GRCo, suero que no actúa sobre el receptor anti $H\text{-}2^k$ ni sobre los receptores anti antígenos menores de histocompatibilidad de AKR, disminuye los aumentos alorreactivos en forma significativa ($p < 0.001$). Por lo tanto, el conjunto de los resultados obtenidos apoya la hipótesis de la presencia de receptores para antígenos convencionales sobre células T alorreactivas.

195

Alorreactividad y preñez: células inmunoregulatorias en el ratón recién nacido

Isabel Piazzon, Marta Matusevich, Adriana Déroche, Christiane Dosne Pasqualini

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Desde el punto de vista de la inmunobiología, el feto puede considerarse un injerto alogeneico y como tal, según las leyes de transplante, debería ser rechazado por la madre. De acuerdo a estas mismas leyes, deberían ser los linfocitos T alorreactivos maternos los principales responsables de dicho rechazo. Se han postulado diversos mecanismos inmunorregulatorios para explicar la relación materno-fetal. El objeto de este trabajo consistió en investigar si en el ratón recién nacido (rn) existían células capaces de regular la respuesta T alorreactiva materna. Se inocularon por vía endovenosa ratones F1 (BALB0 x DBA/2) adultos con: *a*) 1 x 10^6 esplenocitos de ratones Fl (BALB0 x DBA/20) rn; *b*) 4 x 10^6 timocitos de ratones Fl (BALB0 x DBA) rn; *c*) solución fisiológica. Dos horas después se desencadenaron en los mismos, reacciones de injerto contra huésped con esplenocitos de ratones adultos de las cepas materna o paterna. Se utilizó el ensayo local de Ford y Simonsen inoculándose 4 x 10^6 esplenocitos en la almohadilla plantar derecha; 7 días después se extrajeron los ganglios poplíteos y se estableció la diferencia de peso entre el ganglio poplíteo derecho y el contralateral, lo que permite cuantificar la reacción de injerto contra huésped. Los resultados obtenidos fueron: esplenocitos F1 rn + esplenocitos BALB: 0.00 ± 0.07 mg (n = 11); esplenocitos F1 rn + esplenocitos DBA/2: 0.57 ± 0.19 mg (n = 11); timocitos F1 rn + esplenocitos BALB: 0.08 ± 0.10 mg (n = 6); timocitos F1 rn + esplenocitos DBA/2: 1.22 ± 0.18 mg (n = 6); esplenocitos BALB: 0.55 ± 0.11 mg (n = 15); esplenocitos DBA/2: 0.69 ± 0.12 (n = 29). Como puede observarse, la inoculación de esplenocitos y timocitos provenientes de los ratones F1 recién nacidos inhibe las reacciones de injerto contra huésped desencadenadas por células de la cepa materna BALB ($p < 0.001$ y $p < 0.05$ respectivamente) y no modifica significativamente las reacciones desencadenadas por células de la cepa paterna DBA/2. En conclusión, se han detectado tanto en el bazo como en el timo de ratones recién nacidos, células capaces de regular la respuesta T alorreactiva de la madre contra los antígenos de histocompatibilidad paternos e incapaces de modificar la respuesta alorreactiva T del padre contra los antígenos de histocompatibilidad maternos. Serían estas células uno de los mecanismos puestos en marcha para proteger al feto del ataque citotóxico por parte de los linfocitos T alorreactivos de la madre. Queda por determinar si estas células inmunorregulatorias son de origen fetal o materno.

196

Estudio sobre la producción de anticuerpos coprecipitantes en conejos inmunizados a repetición con diversos antígenos

G. Perdigón, C. Abatángelo, T. Gentile, J. Dokmetjian, R. A. Margni

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

En trabajos anteriores hemos demostrado que los anticuerpos coprecipitantes son anticuerpos que se comportan como bloqueantes debido a que uno solo de sus sitios de combinación se une al antígeno con alta afinidad. Dichos anticuerpos aparecen a lo largo de la respuesta inmune inducida por cualquier antígeno T. dependiente. Cuando el antígeno es soluble, en una respuesta inmune normal la relación Ac pp/Ac copp es 85/15. Si el antígeno es particulado y se administra a repetición por un período prolongado, esa relación se modifica aumentando notablemente la proporción de anticuerpos coprecipitantes, tal como ha sido demostrado en conejo, para *Salmonella typhi*. Un hecho similar ha sido observado en algunas infecciones crónicas (brucelosis, salmonelosis). En esta oportunidad se estudió la respuesta inmune a varios antígenos tratando de esclarecerse cuáles son las causas que determinan la mayor producción de este tipo de anticuerpo y cómo puede modularse dicha respuesta. Se inmunizaron conejos, por vía subcutánea, semanalmente durante 28 semanas con los siguientes antígenos: *a*) ovoalbúmina soluble; *b*) ovoalbúmina polimerizada; *c*) brucelas Z y *d*) brucelas a las que se les unió covalentemente ovoalbúmina, evaluándose en este caso la respuesta para ambos antígenos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: el lote de animales inmunizados con antígeno soluble (ovoalbúmina 1 mg/ml en cada estímulo), respondió con un nivel de anticuerpos coprecipitantes que no superó el 15 % del total de anticuerpos en el tiempo de la experiencia. En los conejos que fueron inoculados con antígeno particulado (brucelas-ovoalbúmina 1 ml de 10^9 bac/ml) durante las primeras 14 semanas no se observó aumento significativo en los anticuerpos coprecipitantes tanto para la brucela como para ovoalbúmina; nivel que comenzó a incrementarse a partir de la 15ª semana llegando a constituir un 50 % del total de los anticuerpos en la semana 28. Esos porcentajes fueron establecidos en base al título de anticuerpos determinados por hemaglutinación y ensayo de coprecipitación (antígenos solubles) y reacción de Coombs (antígenos particulados). Idénticos resultados se obtuvieron en los conejos testigos inoculados con brucelas. En los animales inoculados con ovoalbúmina polimerizada (1 ml de 1 mg/ml), la respuesta fue diferente, ya a la 4ª semana y hasta la 20ª, los anticuerpos coprecipitantes llegaron al 50 % del total. Este nivel decayó en la 24ª semana al volverse tolerogénicos los animales. Considerando los resultados anteriores se puede concluir que la mayor producción de anticuerpos coprecipitantes está relacionada con la forma de presentación del antígeno y el tamaño de la partícula antigénica. Los trabajos continúan a efectos de establecer la influencia del número de epitopes en la molécula y la posible participación de células T supresoras en la modulación de dicha respuesta.

197

Eliminación de la citotoxicidad inespecífica con EDTA

M. A. Isturiz, Mirta Giordano, Norma E. Riera

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y CEFAPRIN, CONICET, Buenos Aires

La citotoxicidad celular anticuerpo dependiente (CCAD) es una reacción que consiste en la agresión de una célula, parásito o bacteria (célula "blanco") por parte de una célula efectora que reconoce anticuerpos específicos en la membrana de la célula "blanco". Ciertos linfocitos, monocitos y polimorfonucleares (PMN) han sido descriptos como células efectoras del sistema. Por otra parte el suero humano normal induce citotoxicidad inespecífica (CI) sobre algunas células efectoras normales utilizando células "blanco" no sensibilizadas. Estudiando el efecto de EDTA en la actividad de sueros humanos normales sobre células mediadoras de CCAD, se encontró en forma accidental que las células efectoras pretratadas con EDTA no lisaban en forma inespecífica

a las células "blanco". La CI es más marcada cuando se utilizan PMN como células efectoras. En muchas ocasiones la CI dificulta la interpretación de los datos obtenidos en CCAD por superposición de efectos. Con el fin de eliminar la CI en los ensayos de CCAD que usan PMN como células agresoras, estudiamos el efecto del EDTA sobre la actividad citóxica de estos leucocitos. Los PMN se obtuvieron por centrifugación de sangre periférica humana sobre Ficoll-Hypaque. Se tomó el fondo del gradiente (PMN y glóbulos rojos) y se hizo sedimentar en dextrán al 6 % en solución fisiológica, eliminándose finalmente los glóbulos rojos contamitantes por lisis hipotónica. El 95 % de las células así purificadas son PMN. La CCAD se midió utilizando como células "blanco" eritrocitos de pollo marcados con ^{51}Cr y sensibilizados con anticuerpos específicos. La misma célula "blanco", pero sin sensibilizar, se usó en el ensayo de CI. Para calcular los porcentajes de lisis se consideraron las cpm liberadas al sobrenadante refiriéndolas al total de cuentas ofrecidas al sistema. Se incubaron 2 x 10^6 PMN en 0.2 ml de medio de cultivo (TC-199) o en 0.2 ml de TC-199 con EDTA 10 mM de concentración final (PMN-EDTA), durante 30 minutos y con agitación intermitente. Al final de este período las células fueron lavadas, agregándose los eritrocitos marcados e incubando 18 horas a 37° C. Los resultados de la CI fueron: PMN = 26.1 % $\pm$ 5.8; PMN-EDTA = 1.6 % $\pm$ 1.8. Simultáneamente se midió CCAD con cuatro concentraciones de células, incubándolas 2 horas a 37° C. Los resultados fueron los siguientes: PMN 1 x 10^5 células = 1.5 %; 2 x 10^5 células = 8.3 %; 4 x 10^5 células = 16.5 % y 6 x 10^5 células = 21.3 %; PMN-EDTA: 1 x 10^5 células = 1.8 %; 2 x 10^5 células = 11.8 %; 4 x 10^5 células = 16.4 % y 6 x 10^5 células = 19.3 %. La medición de CCAD nos permite asegurar que el tratamiento de los PMN con EDTA no altera la viabilidad celular, ya que es bien conocido que esta función depende absolutamente de la presencia de células vivas. En base a estos resultados concluimos que el pretratamiento de PMN con EDTA elimina la CI mediada por estas células permitiendo cuantificar únicamente el efecto debido a CCAD.

198

Acción de la amiodarona sobre la secreción tiroidea en el hombre

Liliana Contreras, Silvia Bosco, Patricia Willson, R. E. Beretervide, A. A. Zaninovich

Laboratorio de Investigaciones Endocrinológicas, CONICET, Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas José de San Martín y Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires

La amiodarona, droga usada en cardiología para el tratamiento de las arritmias, tiene 38 mg de iodo/100 mg de droga, es decir 250 veces más que la dosis fisiológica diaria de este halógeno. Un paciente que tome 2 grageas por día ingiere, en consecuencia, 1000 veces más de iodo que el que necesita para el normal funcionamiento de la glándula tiroides. Ello explica que sea frecuente la incidencia de hipertiroidismo o hipotiroidismo en pacientes medicados con este producto. El presente trabajo estudió el efecto de esta substancia sobre la secreción tiroidea en pacientes con tratamiento crónico y en sujetos normales medicados en el curso del estudio. Se estudiaron hasta el presente 6 casos. *Métodos:* Se empleó un método de doble isótopo descripto anteriormente (Zaninovich et al, *J Clin Endocrinol Metab* 49: 533, 1979). Se administró a cada paciente 200 μCi de ^{131}I, seguido 5 días después por la inyección iv de 80 μCi de ^{125}I-T4, obteniéndose muestras de sangre cada 24 horas y colección de orina cada 12 horas. El suero fue precipitado con ácido tricloroacético obteniéndose el $PB^{131}I$ y el $PB^{125}I$. A partir de la radioactividad urinaria y plasmática, se obtuvieron los siguientes índices: relación urinaria (U) $^{131}I/^{125}I$ que mide la secreción tiroidea de iodo total. $U^{131}I/PB^{131}I$ que mide el clearance deiodinativo de la secreción tiroidea marcada con ^{131}I. $U^{125}I/PB^{125}I$ que mide el clearance deiodinativo de la ^{125}I-T4 exógena. Los parámetros del metabolismo periférico de la ^{125}I-T4 (exógena) se obtuvieron por la curva de regresión sérica del $PB^{125}I$ calculada por el método de los cuadrados mínimos.

La relación T4 sérica (estable)/PB^{125}I describe una pendiente ascendente que refleja la secreción de tiroxina por la tiroides. *Resultados:* Todos los parámetros mostraron que la amiodarona deprimió moderadamente la secreción de tiroxina. El recambio de T4 durante el tratamiento en todo el grupo fue de 8.9 %/día, mientras que en el período control de 3 de estos pacientes fue de 12.1 %/día. La degradación de T4 disminuyó un 39 % con la amiodarona respecto al período control. En los pacientes con tratamiento crónico (donde no hubo período control) la fracción de recambio fue de 8.8 %/día y la degradación diaria de T4 de 78.8 ± 30 µg, valores bajos y similares al período con amiodarona de los sujetos normales. La pendiente sérica ^{127}I-T4/PB^{125}I disminuyó al administrar amiodarona (0.370 ± 0.46 vs 0.090 ± 0.02) indicando menor secreción de T4. La pendiente urinaria ^{131}I/^{125}I aumentó con la amiodarona, lo que reflejaría mayor secreción de iodo inorgánico por la tiroides por exceso en su ingestión. *Conclusión:* En los pacientes estudiados la amiodarona deprimió moderadamente la secreción hormonal y aumentó la secreción de iodo no hormonal por la glándula tiroides. Una mayor casuística está en estudio.

199

Efecto del 17-beta estradiol sobre la organificación intratiroidea del yoduro in vitro

H. M. Targovnik, Viviana Varela, Cristina Paz, María I. Lopardo, A. B. Houssay, A. A. Zaninovich

II Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Medicina y Laboratorio de Investigaciones Endocrinológicas, CONICET, Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires

Estudios recientes de estos laboratorios demostraron que a diferencia de lo que sucede en el hombre los estrógenos descienden los niveles séricos de T4 en la rata. Este efecto puede deberse a una disminución en la síntesis o en la secreción de T4. En el presente trabajo se estudió la acción in vitro del 17-beta estradiol (E) sobre la organificación intratiroidea del yoduro en lóbulos de tiroides aislados de ratas hembra Sprague Dawley adultas. Los lóbulos tiroideos fueron incubados a 37° C durante 2 horas en un medio standard pH = 7.4 que contenía Cl_2Ca 1 mM, SO_4Mg 1.3 mM, ClNa 130.8 mM, D-glucosa 10 mM, ClK 4 mM y PO_4HNa_2 8.6 cM. En cada frasco, conteniendo un lóbulo de tiroides, se agregaron 5 µCi de ^{125}I; la concentración final de IK fue de 10^{-20} M. Cinco concentraciones diferentes de E fueron estudiadas, desde $^{10-4}$ a 10^{-8}. El porcentaje de incorporación del ^{125}I a las proteínas intratiroides (PB^{125}I intratiroideo) fue medido por precipitación de proteínas por el ácido tricloroacético al 20 %. Los homogenatos tiroideos luego de ser tratados durante 16 h con proteasa fueron cromatografiados en un medio de butanol: ácido acético glaciar: agua (4 : 1 : 2) con el fin de estudiar la incorporación de ^{125}I a las yodotirosinas. El PB^{125}I intratiroideo en cada una de las concentraciones de E y su valor de probabilidad respecto del grupo control fueron los siguientes: grupo control 41.6 ± 1.8 % (media ± ES); E 10^{-4} M: 32.1 ± 3.0 % ($p < 0.001$); E 10^{-5} M: 31.6 ± 2.5 % ($p < 0.001$); E. 10^{-6} M: 33.7 ± 2.2 % ($p < 0.01$); E 10^{-7} M: 37.4 ± 3.2 % ($p < 0.05$) y E 10^{-8} M: 37.6 ± 3.3 % (NS). El porcentaje de ^{125}I incorporado a las yodotirosinas fue: grupo control 57.6 ± 2.3 %, E 10^{-4} M: 36.7 ± 2.1 % ($p < 0.001$); E 10^{-5} M: 35.0 ± 2.8 % ($p < 0.001$); E 10^{-6} M: 42.7 ± 4.2 % ($p < 0.001$); E 10^{-7} M: 47.3 ± 4.1 % ($p < 0.05$); E 10^{-8} M: 54.0 ± 2.8 % ($p < 0.05$). En preparados donde se agregó a la tiroides solamente el solvente de los estrógenos (etanol) no hubo cambios en los valores de organificación en ninguna de las concentraciones de E usadas respecto del control. Estos resultados sugieren que el E produce in vitro un bloqueo parcial sobre la organificación intratiroidea del yoduro lo que guarda correlación con el descenso de la T4 total circulante observado en la rata. Otros mecanismos, como ser una alteración de la secreción tiroidea también podrían ser responsables de este efecto de los estrógenos sobre la T4 circulante, lo cual está en estudio.

200

Síntesis y liberación nucleocitoplasmática de RNA durante la maduración cerebral. Estudio comparativo entre hipotiroidismo y malnutrición

Beatriz H. Duvilanski, Francisca E. Domínguez, C. J. Gómez

Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

El crecimiento y maduración del Sistema Nervioso Central son eventos regulados en gran medida por la hormona tiroidea, que actuaría primariamente sobre el metabolismo de los RNAs. Dado que el hipotiroidismo neonatal puede producir malabsorción de nutrientes es importante discriminar entre los efectos propios de la deficiencia hormonal y la malnutrición con respecto a la síntesis y destino de los RNA durante la maduración cerebral. En un trabajo previo demostramos que el hipotiroidismo y la desnutrición alteran en forma semejante la síntesis in vivo de los RNA, la agregación polisomal y la síntesis de proteínas. Sin embargo, la liberación nucleocitoplasmática de los RNA es diferentemente modificada por estas condiciones patológicas. Para poder determinar en qué medida los efectos del hipotiroidismo o la malnutrición sobre la liberación nuclear de RNA suceden a nivel de mecanismos de regulación de origen nuclear o citoplasmático estudiamos mediante un sistema libre de células la salida de RNA desde núcleos premarcados in vivo por inyección intracerebral de ácido orótico tritiado, a un medio que contenía o no citosol (homólogo o heterólogo). La salida de RNA en este sistema es dependiente de temperatura, energía y es importante la relación ATP/Mg^{++}. Este estudio se realizó en ratas Wistar de 10 a 30 días de edad. 1) Efecto del citosol homólogo: El transporte de RNA desde núcleos normales (N), Hipotiroideos (H) y malnutridos (M) es estimulado significativamente por la presencia de citosol en el medio de incubación, a ambas edades y tiempos estudiados. Ej.: % RNA liberado desde núcleos N premarcados 30 min: — citosol: 2.1 ± 0.4; + citosol: 7.9 ± 0.6 ($p < 0.001$), 247 % de estimulación. Idem para núcleos premarcados 120 min: — citosol: 11.7 ± 0.4; + citosol: 32.6 ± 1.4 ($p < 0.001$), 179 % de estimulación. 2) Experimentos cruzados: *a)* liberación de RNA mensajeros: la condición experimental de donde procede el citosol no influye sobre la tasa de liberación de estos RNAs desde el núcleo. Esto sugiere que el hipotiroidismo o la malnutrición no afectarían los factores citoplasmáticos implicados en el transporte nucleocitoplasmático de RNAm. *b)* liberación de RNA ribosomal: el hipotiroidismo neonatal alteraría el transporte de esta clase de RNA por afectar los factores citoplasmáticos. La incubación de núcleos hipotiroideos en presencia de citosol normal incrementa notablemente el transporte de RNA ribosomal. Ej.: % liberación de RNA desde núcleos H: + citosol hipotiroideo: 19.8 ± 0.9; + citosol normal: 28.2 ± 0.7 ($p < 0.001$). % liberación de RNA desde núcleos N: + citosol normal: 32.8 ± 0.6; + citosol hipotiroideo: 24.7 ± 1.4 ($p < 0.001$). Esto no sucede con el transporte de RNA ribosomal desde los núcleos de animal malnutrido. Estos resultados sugieren que aunque el efecto final producido por el hipotiroidismo y la malnutrición sobre la síntesis de RNA y proteínas sea semejante los mecanismos por los cuales esto sucede parecen ser diferentes. Por otro lado, se han purificado parcialmente los factores citoplasmáticos relacionados al transporte de RNA ribosomal.

201

Efecto del líquido folicular porcino sobre la secreción de gonadotrofinas en monos

Valeria Rettori, R. H. Asch, Theresa M. Siler-Khodr, C. J. Pauerstein

Departament of Obstetrics and Gynecology, The University of Texas, San Antonio, U.S.A.

Se ha demostrado que el líquido folicular porcino libre de esteroides contiene una sustancia denominada inhibina o foliculostatina que disminuye los niveles de FSH sérica sin afectar los niveles de LH en diversas especies, entre ellos, en monas ovariectomizadas. Por otra parte, se ha demostrado que la presencia del líquido folicular en el medio de cultivo de células

hipofisarias de rata inhibe selectivamente la secreción de FSH pero si se agrega LH-RH la inhibición se ejerce no sólo sobre la secreción de FSH sino también sobre LH, pero en menor grado. En el presente trabajo hemos estudiado el efecto de la administración del líquido folicular porcino libre de esteroides con actividad inhibínica sobre los niveles séricos de FSH y LH y sobre la respuesta pituitaria al LH-RH. Con tal fin se utilizaron 4 monas (*Macacca mulatta*) castradas 2 años antes. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena femoral luego de administrar una dosis tranquilizante de ketamina. Luego de la obtención de muestras basales, el líquido folicular porcino libre de esteroides, fue administrado sc en 2 dosis con 6 h de intervalo. Se obtuvieron muestras de sangre a las 3, 6, 21, 24 y 27 h. Luego se administró LH-RH (150 μg) iv y se tomaron muestras de sangre a los 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 180 min. Dos meses antes los mismos animales recibieron una inyección de solución fisiológica y de LH-RH con un esquema similar. Las determinaciones de FSH y LH fueron realizadas por radioinmunoanálisis. La administración del líquido folicular porcino produjo una disminución significativa ($p < 0.01$) de los niveles séricos de FSH a 21, 24 y 27 h. Los niveles séricos de LH no fueron significativamente modificados. La administración de LH-RH produce una elevación significativa de FSH y LH a los 10, 20, 30 y 60 min. La administración de líquido folicular inhibió la respuesta pituitaria al LH-RH. La liberación de FSH fue inhibida a los 10, 20, 30 y 60 min ($p < 0.05$). La liberación de LH fue sólo inhibida a los 20 y 30 min ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que la acción selectiva inhibitoria del líquido folicular porcino sobre la secreción de FSH requiere un período de tiempo y podría resultar de la acción sobre la síntesis de FSH. El efecto inhibitorio cuando se administra LH-RH exógeno es menos específico y sugiere un mecanismo de acción diferente. La inhibición del pico de liberación de ambas gonadotrofinas observada a los 20 min de la administración de LH-RH nos induce a pensar que la sustancia con acción inhibínica presente en el líquido folicular podría tener importancia en el mecanismo de regulación de la secreción de FSH y LH.

202

Efectos de la administración de etanol sobre el eje prolactínico hipotálamo-hipofisario

Adriana Seilicovich, Valeria Rettori, Beatriz Duvilanski, María del Carmen Díaz, O. R. Koch, L. Debeljuk

Centro de Investigaciones en Reproducción y II Cátedra de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Ha sido demostrado que el alcohol puede modificar la liberación de gonadotrofinas. Dicho efecto se produciría mediante una acción sobre el eje hipotálamo-hipofisario, probablemente por inducción de cambios en la concentración y/o metabolismo de los neurotransmisores hipotalámicos. En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la administración crónica y aguda de etanol sobre los niveles séricos y la concentración hipofisaria de prolactina, y sobre la actividad de la glutámico decarboxilasa (GAD) hipotalámica. Fueron utilizadas ratas Wistar macho adultas. La alcoholización crónica fue realizada durante tres meses mediante una dieta basal y, en forma separada, una solución de sucrosa 25 %-etanol 32 % (p/v) ofrecida *ad libitum* en tubos de bebida tipo Richter. Los animales control recibieron una dieta sólida similar, pero el alcohol fue reemplazado isocalóricamente por sucrosa. El efecto agudo de etanol fue estudiado en ratas que fueron inyectadas ip con solución salina o una solución de etanol (25 % p/v) en solución salina a la dosis de 5 g/kg de peso corporal. Sesenta minutos más tarde los animales fueron inyectados con sulpirida (100 μg/rata) o solución salina. Veinte minutos después los animales fueron sacrificados por decapitación. En todos los casos se obtuvo sangre del tronco y se extrajo hipófisis e hipotálamo. En las muestras de suero e hipófisis se determinó la concentración de prolactina por radioinmunoanálisis. La actividad de GAD en los hipotálamos fue determinada por el método radioquímico de Albers y Brady modificado. Los resultados

fueron analizados por el test "t" de Student o por el test de Duncan. La administración crónica de etanol no modificó los niveles séricos ni la concentración hipofisaria de prolactina. Sin embargo, se observó que la actividad de GAD hipotalámica en el grupo tratado con alcohol (706.98 $\pm$ 7.71 μmoles/g prot/h) era mayor ($p < 0.001$) que en el grupo control (543.71 $\pm$ 13.51). La administración aguda de etanol incrementó ($p < 0.05$) los niveles de prolactina sérica (37.54 $\pm$ 6.94 ng/ml) comparado con los niveles del grupo tratado con solución salina (18.68 $\pm$ 2.98). Los niveles séricos de prolactina después de la administración de sulpirida en el grupo tratado con alcohol (670.00 $\pm$ 128.61) eran mayores ($p < 0.001$) que los del grupo control (362.54 $\pm$ 18.71). La concentración hipofisaria de prolactina en el grupo tratado con etanol no difería de aquella del grupo control, así como no se modificó por la administración previa de sulpirida. Por el contrario, la sulpirida en el grupo control disminuyó ($p < 0.01$) la concentración de prolactina hipofisaria. La actividad de la GAD hipotalámica era menor ($p < 0.01$) en el grupo tratado con alcohol (456.72 $\pm$ 13.78 μmoles/g prot/h) que en el grupo control (552.88 $\pm$ 22.13). Estos resultados demuestran que la administración de alcohol por un tiempo prolongado activa la síntesis de GABA en el hipotálamo. La administración aguda de etanol disminuye la actividad de la GAD hipotalámica y produce una hiperprolactinemia sin depleción hipofisaria de prolactina.

203

Efecto de la denervación simpática sobre la función del epidídimo de la rata

Alejandra D. Piazza, P. Lowenstein, J. A. Blaquier, D. P. Cardinali

Instituto de Biología y Medicina Experimental y CEFAPRIN (Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales), Buenos Aires

Recientes investigaciones han demostrado la importancia de las interrelaciones neuroendocrinas. Dos ejemplos conspicuos son: la inhibición de la hipertrofia compensadora por hemicastración en el ovario denervado y la disminución del número de sitios receptores para andrógenos en la glándula pineal denervada. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el efecto de la denervación del epidídimo sobre su función. Se utilizó como denervante farmacológico la 6-hidroxidopamina, que fue inyectada bajo la cápsula del epidídimo a la dosis de 1 mg por órgano. Los animales fueron sacrificados 30 días más tarde. La determinación del contenido de noradrenalina en el tejido epididimario arrojó un valor de 53 $\pm$ 18 pg/mg de tejido para los controles y 2.3 $\pm$ 0.8 pg/mg de tejido para las tratadas, lo que configura una disminución del 96 %. Se determinaron los pesos de distintos órganos, encontrándose una caída significativa en el peso del testículo (1530 $\pm$ 49 mg en el control vs 977 $\pm$ 84 mg en el tratado, $p < 0.001$) y del epidídimo (550 $\pm$ 80 mg en el control vs 484 $\pm$ 21 mg en el tratado, $p < 0.025$), mientras que no se observó variación alguna en el peso de la próstata y vesículas seminales. Un efecto notable fue la disminución del número de espermatozoides contenido en los distintos segmentos epididimarios, del orden del 90 % en todos los casos (Controles: 3.06; 348 y 9.73 $\times$ 10^6 espermatozoides/100 mg de peso, en cabeza, cuerpo y cola, respectivamente, vs 0.27; 0.19 y 0.46 $\times$ 10^6 espermatozoides en los mismos segmentos de ratas tratadas, $p < 0.005$). La concentración de testosterona en el suero no presentó diferencias entre las ratas controles y las tratadas. La fertilidad de las ratas fue estudiada enjaulando cada macho individualmente con dos hembras durante los 10 días anteriores al sacrificio. En el grupo control 8/20 hembras resultaron preñadas, mientras que en las tratadas solo 1/17 hembras fue preñada. El número de sitios receptores citoplasmáticos para andrógenos, medido por medio de una técnica de intercambio con el ligando radiactivo trimetiltrienolona (R 1881), disminuyó sensiblemente en las ratas tratadas sin que se encontraran cambios en la constante de disociación. Estos resultados, si bien preliminares, sugieren la importante contribución de un componente neural en la regulación de la función del epidídimo. (Los autores desean agradecer a la Dra. Marta Barontini de Gutiérrez el haber efectuado las determinaciones de noradrenalina).

204

Identificación de proteínas específicas andrógeno - dependientes en el epidídimo humano

LUCRECIA PIÑEIRO, J. G. TEZÓN, MÓNICA H. VÁZQUEZ, J. A. BLAQUIER

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Evidencias acumuladas en los últimos años sugieren la participación de proteínas epididimarias andrógeno-dependientes en el proceso de maduración de los espermatozoides. El objetivo de este trabajo fue la identificación en el epidídimo humano de proteínas que cumplieran las siguientes premisas: 1) su producción local y secreción al fluido epididimario, 2) síntesis bajo control androgénico y 3) asociación con los espermatozoides. Se utilizó una técnica de cultivo de órganos que permite mantener el tejido durante 8 días o más y en el cual hemos demostrado una respuesta al agregado de andrógeno al medio. Se realizaron experimentos de doble marcación isotópica, sometiendo los cultivos (4 días) a un pulso (3 h) de ^{14}C-aminoácidos (control) y ^{3}H-aminoácidos (testosterona 10^{-7} M). Iguales cantidades de proteínas solubles de ambos cultivos fueron analizadas por co-electroforesis en geles de poliacrilamida 6-12 % (gradiente lineal). En algunos casos se agregó acetato de ciproterona 10^{-5} M al medio de los cultivos estimulados con testosterona. Luego de fraccionar los geles a 1 mm, se determinó la relación $^{3}H/^{14}C$ en cada sección. Los resultados obtenidos de 7 experimentos permiten distinguir, a pesar de la variabilidad encontrada, zonas de estimulación específica, inhibidas por el acetato de ciproterona, que se corresponden con bandas observadas en la electroforesis del citosol de epidídimo normal. Los picos de estimulación tienen una movilidad electroforética relativa a la albúmina (Ra) de 0.18; 0.25; 0.43; 0.72; 0.85; 0.98, y 1.11, con porcentajes de estimulación con respecto de la media de: 30 %, 35 %, 55 %, 25 %, 40 %, 30 % y 10 %, respectivamente. La estimulación de la síntesis de estos componentes fue mayor en los segmentos proximales del órgano. La vida media estimada para las proteínas excede las 9 h y algunas evidencias sugieren que el pico Ra 1.11 sería un precursor. El análisis del fluido epididimario, obtenido por perfusión de la cola del órgano, reveló la presencia de bandas coincidentes con los picos de estimulación. Asimismo, la electroforesis de extractos proteicos obtenidos de la extracción de espermatozoides provenientes de los segmentos distales del órgano con un medio salino hipertónico (NaCl 0.5 M) indicó la presencia de 3 bandas de importancia, de Ra 0.72, 0.85, 0.98, también coincidentes con las zonas de estimulación. Habría de este modo, al menos 3 proteínas que satisfacen los requisitos necesarios para que continúe su estudio como posibles factores de maduración.

205

Captación, metabolismo y unión de andrógenos por el epidídimo humano mantenido en cultitvo de órgano

J. TEZÓN, PATRICIA CUASNICÚ, J. A. BLAQUIER

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Hasta el momento habíamos demostrado la posibilidad de mantener túbulos epididimario humanos por más de 8 días en un sistema de cultivo de órganos. Nuestro siguiente objetivo consistió en un estudio de la captación, metabolismo y unión a receptores de los andrógenos agregados al medio de cultivo durante 6 h. La captación de ^{3}H-testosterona por el tejido, mostró un aumento continuado durante las primeras 3 h, para luego permanecer constante. La testosterona (T) del medio, que representaba el 85 % de la radiactividad a los 15 min disminuyó a un 45 %, mientras existía un considerable aumento en la concentración de 5α DHT y 5α androstandioles desde un 6 % y 9 % hasta un 33 % y 22 %, respectivamente, al final del período estudiado. La unión específica en la fracción citoplasmática soluble, mostró un rápido aumento hasta un máximo de 4.12 fmoles/mg pro-

teína a los 90 min, seguida por una disminución en las próximas 6 h. El esteroide específicamente unido en esta fracción fue la 5 α DHT a todos los tiempos (53 % a los 15 min y 66 % a las 6 h), mientras que la T disminuyó el 23 % a los 15 min al 12 % a las 6 h. La unión específica intranuclear fue de 7 a 10 veces mayor que la citosólica, alcanzando un máximo de 27 fmoles/mg proteína a las 3 h y manteniéndose en este valor luego de 6 h. La proporción de radiactividad total específicamente unida fue: 20.8 % a los 15 min; 48.4 % a los 90 min, y 39.5 % a las 3 y 6 h. Con el objeto de determinar el tiempo de retención del esteroide unido dentro del núcleo, se agregó un exceso de T luego de 3 h de marcación encontrando que la radiactividad específica disminuía en un 50 % luego de 9 h para sólo existir trazas al cabo de 19 h. La 5 α DHT, que dentro del núcleo representaba el 59 % a los 15 min alcanzó un 82 % a los 90 min y permaneció en este valor durante todo el período estudiado. Dado que de estos experimentos se podía deducir la existencia de receptores con afinidad específica por andrógenos, nuestro último paso consistió en una caracterización de algunos aspectos de los mismos. El estudio de la influencia de la temperatura de incubación sobre la unión específica de ^{3}H-R 1881, demostró que la marcación era máxima a 10° C. En estas condiciones la constante de disociación fue estimada en 1.5 x 10^{-10} M, y el número de sitios de unión fue 310 fmoles/mg DNA. El sistema descrito ofrece posibilidades para el estudio de la fisiología del epidídimo humano. Debe destacarse la similitud del comportamiento del tejido humano y el de diferentes animales de experimentación.

206

Mecanismo de la acción antiandrogénica de inhibidores de la 5αreductasa en el epidídimo de rata en cultivo de órgano

MÓNICA H. VÁZQUEZ, J. G. TEZÓN, J. A. BLAQUIER

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

El epidídimo recibe como principal andrógeno a la testosterona proveniente del testículo. Sin embargo, al examinar el tejido epididimario se observa un activo metabolismo hacia compuestos 5 α reducidos, principalmente 5 α DHT y 5 α androstan 3-17-diol, los que son acumulados y se unen preferencialmente (DHT) al receptor para andrógenos. Para estudiar la acción de cada uno de estos andrógenos *per se* sobre el tejido epididimario, resulta necesario inhibir el metabolismo y, para este fin, diseñamos experimentos para probar la efectividad de distintos inhibidores aplicados a túbulos de epidídismo de rata mantenidos en cultivo de órgano. Obtuvimos los compuestos 21-metil-4-pregnen-3.20-diona y 5-10 seco-19-norpregnan-4-5-dieno-3, 10, 20-triona, que habían demostrado ser eficientes inhibidores de la 5 α reductasa en incubaciones de núcleos de próstata. Se midió el metabolismo de testosterona tritiada en presencia de una concentración de inhibidor 100 veces mayor, durante cultivos de 1, 3, 6 y 16 horas. En el medio de cultivo se observó el progresivo aumento de los metabolitos 5 α reducidos, que representaron un 20 % de la radiactividad al cabo de 1 hora y el 85 % luego de 16 horas. La presencia de los inhibidores disminuyó, aunque no significativamente, el porcentaje de metabolismo a los tiempos más cortos. En el tejido el porcentaje de metabolitos 5 α reducidos ya era 95 % al cabo de 1 hora y se mantuvo en el mismo valor hasta las 16 horas. La presencia de ambos inhibidores no alteró este resultado. En vista de los resultados previos, decidimos estudiar la posibilidad de que los inhibidores no tuvieran libre acceso a la célula epididimaria. Para esto se determinó comparativamente su efecto sobre cortes de tejido y sobre una fracción microsomal aislada. Para los microsomas se obtuvo un 50 % de inhibición a 5 x 10^{6} M y un 85 % cuando se lo estudió a la concentración usada en los cultivos (5 x 10^{-5} M). En contraste, iguales concentraciones de inhibidor fueron completamente ineficaces cuando se las probó sobre cortes de tejido. Dado que los compuestos utilizados tienen una estructura análoga a la de los andrógenos, se decidió estudiar su afinidad por el receptor para andrógenos del epidídimo. Los resultados obtenidos indican que, manteniendo la relación de concentración an-

drógeno-inhibidor utilizada en los cultivos, la presencia de los inhibidores produjo un 30 % de disminución en la unión específica de testosterona y un 21 % de disminución cuando se utilizó 5 α DHT Concluimos que estos compuestos no tienen efecto inhibitorio sobre la 5 α reductasa epididimaria, en nuestras condiciones, debido a: 1) presentan dificultad para penetrar en las células y llegar al compartimiento correspondiente, o 2) son metabolizados a compuestos inactivos al ser incubados con células enteras.

207

Modificaciones en las constantes cinéticas de la lactasa intestinal inducidas por la dieta de recuperación en ratas desnutridas desde el destete

Ana Lía Felipoff, María Esther Río

Departamento de Bromatología y Nutrición Experimental, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

La disminución en la actividad de la lactasa intestinal, en presencia de cuadros de desnutrición, ha sido demostrada por diversos grupos de investigación. Como consecuencia de ello, se observa una serie de trastornos gastrointestinales cuando la realimentación se realiza con alimentos que contienen lactosa (leche, fórmulas comerciales de origen lácteo, etc.). Sin embargo, la lactasa es una enzima inducible por sustrato y como proteína su síntesis es dependiente del aporte de aminoácidos en la dieta. Por lo tanto, resulta de gran interés diseñar un modelo experimental que permita determinar el efecto de dietas con diferentes concentraciones de lactosa (sustrato inductor) y diferentes concentraciones de proteínas (aporte de aminoácidos) sobre el Km y la Vmáx de la lactasa durante el período de recuperación. Se trabajó con ratas en estado de depleción proteica desde el destete (edad: 21 días) hasta los 34 días de edad, las cuales se dividieron en grupos de 8 y se realimentaron durante 4 días con una de las 8 dietas experimentales. Las dietas aportaban 2 niveles de concentración proteica (P % 11.4 y 17.0 % de las calorías totales) y diferentes concentraciones de lactosa (% 1, 15, 27 y 37 %). Las ratas se sacrificaron por decapitación a los 38 días de edad y sobre homogeneizados de mucosa intestinal se determinó actividad de lactasa (Método de Dahlqvist, *Enzym biol clin* 11: 52-66, 1970). Los valores de Km y Vmáx se calcularon por el método gráfico de Cornish-Bowden y Eisenthal (*Biochem J* 139: 715-720, 1974). Cuando el P % fue 17.0, se encontraron aumentos en la Vmáx al aumentar la concentración de lactosa en la dieta, pasando de: 96 $\pm$ 16 a 459 $\pm$ 62 (μ M x 10^3/hora) para dietas con 1 % y 37 % de lactosa, respectivamente. Para las dietas con P % 11.4 la Vmáx aumentó de 143 $\pm$ 34 a 281 $\pm$ 40 (μ M x 10^3/hora) al pasar de 15 a 37 % de lactosa. Se encontró un valor anómalo para Vmáx cuando la dieta aportó 11.4 % de calorías proteicas y 1 % de lactosa (356 $\pm$ 75 μ M x 10^3/hora). Los valores de Km disminuyeron significativamente al pasar de P % 11.4 a P % 17.0 (0.041 $\pm$ 0.002 y 0.032 $\pm$ 0.004 M, respectivamente). Se observó una tendencia en aumento del Km con la concentración de lactosa para P % 17.0, pero no se encontraron diferencias significativas en los 4 grupos con P % 11.4. Estos cambios que parecen depender de la concentración de lactosa en el caso de la Vmáx y de la concentración de proteínas, en el caso del Km, podrían ser explicados como modificaciones en las proporciones de isoenzimas de la lactasa intestinal.

208

Función de las prostaglandinas en la unión neuroefectora pineal

D. P. Cardinali, Mónica N. Ritta, Elba Pereyra de Valeije, C. González Solveyra

Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), Buenos Aires

Observaciones previas de este laboratorio sugieren que las prostaglandinas (PGs) están involucradas en el mecanismo de activación noradrenérgica de la glándula pineal. La inyección del inhibidor de la síntesis de PGs indometacina disminuye la activación nocturna de la secreción de melatonina en la rata. El agregado de PGE_2 (1-1000 nM) al medio de cultivo aumenta la acumulación de AMPc pineal, su unión a la quinasa de proteínas, y la

actividad de la N-acetiltransferasa, enzima participante en la síntesis de melatonina. Luego de la exposición de explantos pineales a norepinefrina (NE) se produce un incremento en la síntesis de PGs de las series E y F, las que se unen a sitios receptores específicos en membranas pineales. Los presentes experimentos tendieron a responder los siguientes interrogantes: 1) ¿Afectan las PGs la acumulación y liberación de melatonina en pineales de rata en cultivo organotípico? 2) ¿Modifica la inhibición de la síntesis de PGs la estimulación de la liberación de melatonina producida por NE in vitro? 3) ¿Es afectada por PGs la liberación de NE de los terminales simpáticos pineales? En una primera serie de experimentos grupos de 6-7 explantos pineales fueron incubados a 37° C durante 6 h en TC 199 bajo atmósfera de carbógeno, en presencia de 1-1000 nM de PGE_1, PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$. La concentración de melatonina en los explantos y medios de incubación fue determinada por radioinmunoanálisis. La PGE_2 fue efectiva en incrementar la secreción de melatonina a todas las concentraciones estudiadas, con un máximo en 1 nM, mientras que la PGE_1 sólo tuvo efecto en concentraciones 2-3 órdenes de magnitud mayores. La $PGF_2 \alpha$ careció de actividad en esta preparación. En una segunda serie de experimentos se estudiaron los siguientes inhibidores de la síntesis de PGs: indometacina, aspirina o ácido mefenámico, en concentraciones supramáximas (100 μM). Como estímulo para la secreción de melatonina se utilizó 10 μM de NE; ésta produjo un aumento de 20 veces en la liberación de melatonina, la que fue inhibida en un 48-65 % por el agregado previo del agente bloqueante. En una tercera serie de experimentos se examinó el efecto de 10-100 nM de PGE_1, PGE_2 o $PGF_2 \alpha$ sobre la liberación de NE pineal inducida por un estímulo despolarizante de K^+. Los depósitos endógenos de NE pineal se marcaron por exposición de glándulas de rata a 0.5 μM de NE-^{3}H durante 30 min. Luego de alcanzarse el equilibrio en el eflujo de radiactividad se realizaron dos estimulaciones de 1 min con 80 mM de K^+ (S_1 y S_2) separadas entre sí por 35 min. Las PGs fueron agregadas 20 min antes de S_2. Sólo PGE_2 100 nM deprimió en un 40 % la relación S_2/S_1 (control: 0.92 ± 0.05; PGE_2: 0.56 ± 0.05, $p < 0.05$). Estos resultados demuestran que PGE_2 es un intermediario intracelular en la activación noradrenérgica de la secreción de melatonina. Esta vía es complementaria a la del receptor β-adrenérgico-adenilciclasa, ya que su inhibición total sólo disminuye en parte el aumento de secreción de melatonina dado por NE. Concentraciones mayores de PGE_2 en la biofase sináptica inhiben la liberación de NE por los terminales simpáticos pineales.

209

Inhibición de la producción de prostaciclina en pacientes con inhibidor lúpico

L. O. Carreras, J. Vermylen

Centro de Trombosis e Investigaciones Vasculares, Universidad de Lovaina, Bélgica

Los pacientes con inhibidor lúpico habitualmente no presentan manifestaciones hemorrágicas a pesar de las alteraciones en las pruebas de coagulación. Por el contrario, diversos autores han reconocido la tendencia paradójica de estos pacientes a desarrollar fenómenos trombóticos. Por otra parte, se ha descripto recientemente la asociación del inhibidor lúpico con abortos a repetición. El mecanismo implicado en la asociación entre el inhibidor lúpico y estas manifestaciones clínicas es deconocido. En el plasma de una paciente de 31 años con historia de trombosis arterial recurrente y dos episodios de muerte fetal se detectó la presencia de un inhibidor de tipo lúpico. La serología para lupus eritematoso y lúes dieron resultados negativos. Las inmunoglobulinas de la paciente fueron aisladas por cromatografía de afinidad con Proteína-A-Sefarosa. La actividad inhibitoria sobre la coagulación estaba limitada a la fracción IgG. Se estudió el efecto del plasma de la paciente y sus fracciones sobre la producción de prostaciclina (PGI_2) por la pared vascular. El plasma de la paciente redujo la producción de PGI_2 por anillos frescos de aorta de rata, en comparación con el normal. El efecto inhibitorio sobre la producción de PGI_2 también estaba localizado en la fracción IgG de la paciente. Al agregar ácido araquidónico a la fracción IgG

de la paciente la producción de PGI_2 por anillos aórticos se normalizó. La producción de PGI_2 por un fragmento de miometrio humano gestante incubado con la fracción IgG de la paciente fue también menor que la obtenida con la fracción IgG normal. Por otro lado, la actividad inhibitoria de la PGI_2 sobre la agregación plaquetaria no disminuyó por incubación previa con el plasma o la fracción IgG de la paciente, en comparación con los controles. Esto sugiere que la inmunoglobulina no está dirigida contra la PGI_2. La preincubación del plasma rico en plaquetas (PRP) normal con el plasma o la fracción IgG de la paciente no disminuyó la inhibición de la agregación plaquetaria ejercida por PGI_2 sintética agregada posteriormente. Este experimento sugiere que la inmunoglobulina no interfiere con la unión de la PGI_2 a la membrana plaquetaria. La producción de 6-oxo-prostaglandina $F_{1\alpha}$ (6-oxo-$PGF_{1\alpha}$), producto de degradación de la PGI_2, por células endoteliales bovinas en cultivo se redujo también en presencia de la fracción IgG de la paciente, en comparación con la normal. Los niveles plasmáticos de 6-oxo-$PGF_{1\alpha}$ (medida por radioinmunoensayo) eran aproximadamente 80 pg/ml, en el límite inferior de detección del método. En 10 sobre 16 pacientes adicionales con inhibidor lúpico estudiados, se encontró un efecto inhibitorio del plasma sobre la producción de PGI_2 por anillos frescos de aorta de rata. En 8 de estos pacientes se observaron accidentes trombóticos. El anticoagulante lúpico interfiere con la función de los fosfolípidos en la coagulación El mismo anticuerpo podría interferir con la liberación de ácido araquidónico (sustrato para la producción de PGI_2) a partir de los fosfolípidos de la membrana celular. Dado que la PGI_2 es el más poderoso inhibidor natural conocido de la agregación plaquetaria, la inhibición de su producción podría ser un factor importante en la patogénesis de los fenómenos trombóticos en algunos pacientes con inhibidor lúpico. Considerando que la PGI_2 ejerce importantes funciones en el embarazo y vida fetal, la disminución de su producción podría también contribuir a la ocurrencia de abortos y muertes fetales a repetición en algunas pacientes con este inhibidor.

210

Estudio de la sobrevida de una población con enfermedad de Chagas

T. Caeiro, H. A. Palmero, J. Bas, D. Iosa

Fundación para el Progreso de la Medicina, Hospital Privado, Córdoba

Con el propósito de establecer la sobrevida de pacientes con enfermedad de Chagas se estudiaron 233 sujetos con esta afección atendidos en los últimos 17 años. El diagnóstico se hizo en base a datos epidemiológicos de la historia, positividad de reacciones serológicas y de inmunofluorescencia y anormalidades clínicas, electrocardiográficas y radiológicas que sugieran cardiopatía. A los fines de discriminar subgrupos con posible mayor riesgo de muerte, se analizaron además del grupo total (ECh) los siguientes subgrupos: ECh_1: 87 sujetos (edad promedio 35.6 ± 14 años) con reacciones serológicas y de inmunofluorescencia positivas para Chagas pero sin evidencia de cardiopatía; ECh_2: 146 sujetos (edad promedio 44.3 ± 11.7 años) con reacciones serológicas y de inmunofluorescencia positivas para Chagas y evidencia de cardiopatía. De este último subgrupo se obtuvieron a su vez otros dos: ECh_{2-A}: 69 sujetos ($\bar{x}$: 41.6 ± 11.7 años) con alteraciones electrocardiográficas (bloqueos de rama, bradiarritmia sinusal y ectopía supraventricular o ventricular aislada) pero sin cardiomegalia ni signos de insuficiencia cardíaca, y ECh_{2-B}: 77 sujetos ($\bar{x}$: 46.8 ± 12 años) con cardiomegalia e insuficiencia cardíaca. De este subgrupo con insuficiencia cardíaca se separaron 27 casos ($\bar{x}$: 45.6 ± 16.9 años) con extrasistolia ventricular frecuente y politópica (EF) y 17 casos ($\bar{x}$: 53.4 ± 12.3 años) que por enfermedad del nódulo sinusal o bloqueo auriculoventricular con Stockes-Adams habían requerido la aplicación de un marcapaso definitivo (MP). Para el análisis de sobrevida se utilizó el método de Merrel y Shulman (*J Chron Dis* 1: 12 1955). El error estándar de la sobrevida de 5 y 10 años fue computado por el método de Greenwood (*J Chron Dis* 8: 699, 1958). Se fijó como punto de comienzo de la observación el del diagnóstico y como final el de la muerte

o último control vivo. Para comparación se usaron los datos de mortalidad de la población general (PG) de la provincia de Córdoba obtenidos en el censo de 1970. Las edades de la PG fueron coincidentes con la de los distintos subgrupos chagásicos. La sobrevida global de ECh a 5 y 10 años fue de 94.7 ± 1.36 % y de 89 ± 3.6 %, respectivamente; las diferencias con las de PG (96.8 ± 0.18 % y 91.8 ± 0.28 %) no fueron estadísticamente significativas. No hubo muertos durante el período de observación en los subgrupos FCh_1 y ECh_{2-A}. La sobrevida de 5 y 10 años de los restantes subgrupos chagásicos fue como sigue: ECh_2 95.7 ± 2.08 y 87.1 ± 5.1 %; ECh_{2-B} 90.1 ± 3.8 y 78.2 ± 6.4 %; EF 86.4 ± 5.7 y 61.5 ± 14 % y MP 88 ± 8 y 88 ± 8 %, respectivamente. Las únicas cifras de sobrevida significativamente menores que las de PG fueron las ECh_{2-B} a los 10 años ($p < 0.05$) y las de EF también a los 10 años ($p < 0.05$). De estos resultados se puede concluir que: 1) la sobrevida global de un grupo de chagásicos no difiere de la PG de Córdoba; 2) discriminando en subgrupos, sólo resultaron con menor sobrevida que la PG a los 10 años los chagásicos con cardiomegalia e insuficiencia cardíaca y, sobre todo, aquellos que también tenían extrasistolia ventricular frecuente, y 3) el subgrupo de chagásicos con marcapaso por bradiarritmia, sobrevivieron a los 10 años en un porcentaje similar al de la población general.

211

Hemodinamia comparada de la cardiopatía chagásica crónica (CCC) y la enfermedad coronaria (EC)

H. A. Palmero, T. F. Caeiro, E. Crespo

Fundación para el Progreso de la Medicina, Hospital Privado, Córdoba

Se compararon los datos hemodinámicos de la EC con los de la CCC con el propósito de encontrar caracteres distintivos. Todos los pacientes fueron sometidos a coronario y angiografía ventricular izquierda siguiendo la técnica convencional de Seldinger. Los pacientes con EC y CCC eran portadores de angina de pecho; 26 de los coronarios no tenían infarto de miocradio previo (CS IP) y 24 habían tenido infarto previo (CC IP). Se seleccionó un grupo control (GC) con pacientes con coronarias normales y sin otra cardiopatía. Los volúmenes ventriculares se midieron por planimetría de acuerdo a Green y col (*Circulation* 45: 61-67). Las coronarias de los pacientes con CCC no mostraron lesiones ateromatosas. Las edades medias de los distintos grupos no mostraron diferencias significativas. Comparando con el GC, el índice de volumen de fin de diástole (IVFD) demostró estar significativamente elevado solamente en los CC IP; mientras que el índice de volumen de fin de sístole estaba aumentado significativamente en los CC IP y en la CCC ($p < 0.05$). El índice de volumen expulsivo fue igual en todos los grupos. Los índices contráctiles (fracción de eyección (FE) y relación presión sistólica de ventrículo izquierdo/volumen de fin de sístole (PS/VFS) estaban significativamente descendidos en los CC IP y en la CCC ($p < 0.05$). No hubo diferencias significativas en la presión sistólica del VI; pero la presión de fin de diástole (PFD) de ambos grupos coronarios (CC IP y CS IP) mostraba valores significativamente elevados ($p < 0.05$); no así la CCC que eleva menos la PFD (p: NS). Se concluye que: 1) Los pacientes con EC disminuyen significativamente los índices contráctiles (FE y PS/VFS) cuando existe un infarto previo y el IVFD está significativamente aumentado; mientras que la CCC también disminuye significativamente la FE y PS/VFS aún en presencia de IVFD dentro de los límites normales demostrando un inotropismo proporcionalmente más deprimido; y 2) que los chagásicos elevan menos la PFD que los coronarios indicando una disminución de la distensibilidad miocárdica proporcionalmente menor.

212

Sistema renina angiotensina, aldosterona y kalikreína urinaria en el síndrome urémico hemolítico crónico

B. Grunfeld, M. Deymonnaz, R. Simsolo, J. Mendilaharzu, F. Mendilaharzu, M. Barontini

Hospital de Niños, Buenos Aires

La hipertensión arterial es una grave secuela en un 20 % de niños que padecieron síndrome urémico hemolítico (SUH) en su temprana infancia. El presente trabajo se realizó con el objeto de ahondar en el mecanismo fisiopatológico de su hipertensión arterial. Se estudiaron 20 niños (F: 9 M: 11), de 3 a 15 años de edad, que padecieron su SUH de 2 a 14 años previos a este estudio. En forma simultánea se evaluó el sistema renina angiotensina, mediante la actividad plasmática de renina (APR), la concentración de aldosterona plasmática, y la excreción urinaria de kalikreína en 24 hs (kk). En todos los pacientes se evaluó la función renal con clearance de creatinina y proteinuria de 24 hs. Los dosajes se efectuaron por radioinmunoensayo, con el equipo de Cea-Sorin para la APR, el de Abbot para aldosterona, y la kk por el método estereolítico con el sustrato 2266 de Kabi Diagnóstica. Se dosó kk urinaria en 10 niños normales, que se relacionó con la excreción urinaria de Na y K día, para compararla a la de los pacientes, que fueron divididos en hipertensos (n: 11) y normotensos (n: 9), en base a su tensión arterial según el Reporte de la Task Force. Los niños normales tuvieron una kk $\bar{x}$ 4.7 $\pm$ –0.35 U/24 h (ES), Na urin $\bar{x}$ 98.9 $\pm$ 6.08 mEq/24 h y K urin $\bar{x}$: 40.9 $\pm$ 2.40 mEq/24 h. Los pacientes normotensos presentaron una kk $\bar{x}$: 3.8 $\pm$ 0.76 U/24 h. Na urin $\bar{x}$: 65.6 $\pm$ 2.16 mEq/24 h y K urin $\bar{x}$: 30.5 $\pm$ 1.05 mEq/24 h, aldosterona $\bar{x}$: 146.6 $\pm$ 29.13 pg/ml y la APR $\bar{x}$: 3.36 $\pm$ 0.76 ng/ml/h. Los hipertensos tuvieron una kk de $\bar{x}$: 7.2 $\pm$ 1.56 U/24 h., Na urin $\bar{x}$: 63 $\pm$ 4.88 mEq/24 h., K urin $\bar{x}$: 44.7 $\pm$ 1.49 mEq/24 h., la aldosterona $\bar{x}$: 448 $\pm$ 171 pg/ml y la APR $\bar{x}$: 3.9 $\pm$ 0.67 ng/ml/h. Los principales hallazgos fueron: 1) Los pacientes hipertensos tienen mayor excreción urinaria de kk ($p < 0.05$). La mitad de estos niños presentan hiperaldosteronismo. 2) Se observa en los pacientes normotensos una relación directa entre la concentración de aldosterosa plasmática y la excreción urinaria de kalikreína/24 h. (r: 0.46) ($p < 0.05$). 3) Por el contrario en los pacientes hipertensos se ha perdido toda relación entre el sistema aldosterona y la kalikreína urinaria, (r: 0.15), y entre el sistema renina angiotensina y la kalikreína urinaria (r: –0.21). Estos datos sugieren que los pacientes que padecieron SUH en su temprana infancia, con hipertensión arterial en su etapa crónica, presentan un diferente perfil respecto al estado de su sistema renina angiotensina, aldosterona y kalikreína urinaria, respecto a los que en la actualidad están normotensos.

213

Acción de la progesterona sobre la formación y organización de adherencias pleurales

Teresa Cristina Garegnani, O. Pistoia, A. Lanari

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Es bien conocida la acción de la progasterona sobre las fibromatosis agresivas. Pareció de interés, por consiguiente, averiguar su acción sobre la formación y organización de las adherencias que provoca una gasa colocada en el espacio intrapleural. Para ello, en 20 perros mestizos se les colocó, previa toracotomía en condiciones asépticas, una gasa sobre el lóbulo superior del pulmón izquierdo cerrando luego el tórax y tratando de evitar todo tipo de hemorragia. A un grupo de 10 perros se les administró 100 mg de progesterona intramuscular día por medio y el resto permaneció como grupo control. Fueron reoperados y sacrificados en diferentes períodos de tiempo (10, 30, 60, y 90 días). Se encontró que en los perros tratados con progesterona las adherencias del pulmón a la pared y de la gasa al pulmón, si bien estaban presentes, eran más fáciles de separar. En algunos perros existía una línea de despegamiento entre la gasa y el pulmón. En los perros que no recibieron progesterona, la gasa estaba íntimamente adherida a la pleura visceral y al despegarla se lesionaba el parénquima pulmonar. Esta lesión del pa-

rénquima no ocurría en los perros tratados con progesterona.

214

Estudio de la función respiratoria en trabajadores del asbesto

CELIA BERCOVICH, D. E. BERNASCONI, M. MATUSEVICH, A. F. QUESADA ELÍAS, G. B. SEMENIUK

Instituto de Investigaciones Médicas y Hospital E. Tornú, Buenos Aires

Conociendo la relación entre exposición al asbesto y enfermedad pleuropulmonar, se estudiaron 67 trabajadores de una industria textil que utiliza asbesto en sus distintas formas –principalmente crisotilo, crocidolita y ambosita–. En la mayoría de los trabajadores no fue posible realizar un seguimiento lineal, por lo tanto, se procedió a dividirlos, en el momento del estudio, en tres grupos, de acuerdo a los años de exposición. Grupo 1: de 0 a 5 años; grupo 2: de 6 a 10 años y grupo 3: más de 10 años. El promedio de exposición total fue de 10.4 años, con un máximo de 27 años. Se realizaron historia clínica y examen físico completo, estudio funcional respiratorio (EFR) con un aparato tipo Vitalograph, gases en sangre en reposo, radiografía de tórax y electrocardiograma. Cada grupo se subdividió en: *a*) normales; *b*) EFR alterado con gases en sangre normales o no, y *c*) gases en sangre anormales con EFR normal. Se tomaron como normales, Capacidad Vital (CV) mayor de 90 %; Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo ($VEF_{1.0}$) mayor de 80 % y pO_2 mayor de 80 mmHg. Los síntomas considerados fueron: disnea, tos y expectoración. Valores obtenidos (promedio y desvío standard): Grupo 1 (n = 20): *a*) n = 12 (60 %); fumadores 25 %. *b*) n = 3 (15 %); EFR: incapacidad ventilatoria mixta leve a predominio obstructivo, CV = 81 % ± 10 y $VEF_{1.0}$ = 72 % ± 5; gases en sangre normales; fumadores 67 %; sintomáticos 66 %; *c*) n = 5 (25 %); pO_2 = 73 mmHg ± 4; fumadores 20 %; sintomáticos 25 %. Grupo 2 (n = 16): *a*) n = 11 (69 %); fumadores 45 %. *b*) n = 2 (12 %); EFR: incapacidad ventilatoria mixta moderada, CV = 73 % ± 6; $VEF_{1.0}$ = 68 % ± 0; pO_2 = 79 mmHg ± 3; fumadores 0 %; sintomáticos 50 %. *c*) n = 3 (19 %); pO_2 = 74 mmHg ± 4; fumadores 33 %; sintomáticos 33 %. Grupo 3 (n = 31): *a*) n = 9 (29 %); fumadores 45 %. *b*) n = 18 (58 %); EFR: incapacidad ventilatoria mixta moderada a predominio restrictivo, CV = 72 % ± 11 y $VEF_{1.0}$ = 68 % ± 11; pO_2 = 71 mmHg ± 6; fumadores 50 %; sintomáticos 39 %. *c*) n = 4 (13 %) pO_2 = 76 mmHg ± 1; fumadores 75 %; sintomáticos 50 %. En el total de trabajadores no se encontraron alteraciones radiológicas compatibles con asbestosis, así como tampoco cáncer de pulmón ni mesotelioma. No hubo cambios electrocardiográficos significativos. El 52 % de los trabajadores presentó alteraciones de la función respiratoria, siendo el grupo 3 el más afectado, lo que sugeriría una correlación con el tiempo de exposición. El hábito de fumar no influyó significativamente en los distintos grupos.

215

I. *Efecto de la hipoxia hipobárica crónica sobre la presión arterial y el sistema renina-angiotensina-aldosterona en ratas de ambos sexos*

ISABEL H. MARTIN, D. BAULÁN, NIDIA BASSO, A. C. TAQUINI

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que las ratas de ambos sexos sometidas a hipoxia hipobárica severa durante 7 meses presentaban un significativo aumento de la actividad renínica plasmática (ARP) sin cambios en los niveles de aldosterona en plasma. Por otra parte en los nativos de altura y en ratas macho sometidas a hipoxia hipobárica experimental se ha descripto una disminución de la presión arterial (PA). El presente trabajo se realizó con el objeto de analizar las posibles vinculaciones entre los cambios de ARP y aldosterona plasmática y los niveles de PA desarrollados por animales de ambos sexos sometidos a una presión atmosférica de 440 mmHg. Se usaron 40 ratas Wistar de am-

bos sexos. Veinte de ellas (10 machos y 10 hembras) fueron sometidas a una altura simulada de 4400 m (440 mmHg) en cámara de hipopresión durante 10 semanas mientras las 20 restantes permanecieron como controles en las mismas condiciones de luz (28 lux) temperatura (22 ± 2° C) y alimentación, pero a presión atmosférica normal. Durante ese lapso de tiempo se controló la evolución de la PA media en los dos grupos. Al término del estudio se sacrificaron todos los animales por decapitación y en las muestras de plasma obtenidas se midieron ARP y aldosterona por métodos de radioinmunoensayo. En las ratas hembras hipóxicas la ARP disminuyó significativamente respecto a sus controles (Hipóxicas (H) = 1.72 ± 0.41 ng AgI/ml plasma/h; controles (c): 4.23 ± 0.81, $p < 0.02$) mientras que los niveles de aldosterona plasmática no presentaron cambios significativos entre ambos grupos (H: 62.4 ± 7.4 ng/100 ml de plasma; C: 65.5 ± 6.9 ng/100). En los machos la ARP no fue estadísticamente diferente en los animales hipóxicos con respecto a sus controles (H: 2.97 ± 0.47; C: 4.28 ± 0.78 ng/ml/h) mientras que la aldosterona plasmática aumentó significativamente (H: 53.6 ± 4.4 ng/100; C: 40.0 ± 4.5 ng/100, $p < 0.05$). La PA disminuyó significativamente en las hembras durante todo el período de adaptación a HHC ($p < 0.01$); en los machos la PA disminuyó inicialmente ($p < 0.02$) y se normalizó después de 4 semanas de adaptación. El diferente comportamiento de la PA guarda relación con el diferente comportamiento de la ARP y la aldosterona. Sin embargo los resultados por el momento no permiten establecer entre ambos factores una relación de dependencia. La disociación observada entre ARP y aldosterona plasmática podría deberse a la interacción entre el sistema renina-angiotensina-aldosterona con otras hormonas o a alteraciones en los mecanismos de biosíntesis adrenal o de metabolización hepática debidas a la disminución de oxígeno.

216

II. *Efecto de la hipoxia hipobárica crónica sobre la presión arterial y el sistema renina-angiotensina-aldosterona durante el desarrollo de hipertensión renovascular de ratas de ambos sexos*

Isabel H. Martin, D. Baulán, Nidia Basso, A. C. Taquini

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

En un trabajo previo se observó que ratas intactas sometidas a hipoxia hipobárica crónica (HHC) presentaban una disminución de la presión arterial media (PA). Se encontró además que los cambios de PA estaban vinculados al sexo y se acompañabna con alteraciones del sistema renina-angiotensina-aldosterona. El presente estudio se realizó con el objeto de investigar: 1) si la HHC es capaz de modificar el desarrollo de hipertensión renovascular por isquemia renal bilateral. 2) el comportamiento del sistema renina-angiotensina-aldosterona en esas condiciones. Se utilizaron 36 ratas Wistar de ambos sexos: 18 ratas (9 machos y 9 hembras fueron sometidas a una altura simulada de 4.400 m (440 mmHg) en cámara de hipopresión. A las 4 semanas con un peso promedio de 250 g, se colocó a todos los animales sendos clips de alambre de plata (0.25 mm de abertura) en ambas arterias renales, y posteriormente se los mantuvo en la cámara 10 semanas con control de PA. Un grupo similar de 18 ratas (9 machos y 9 hembras) a los que se colocaron también con 250 gr de peso sendos clips en ambas arterias renales, permanecieron igual tiempo en las mismas condiciones de luz, temperatura y alimentación pero a presión atmosférica normal, con control de PA. Al término del estudio todos los animales se sacrificaron por decapitación. En las muestras de plasma obtenidas se determinaron Actividad Renínica Plasmática (ARP) y aldosterona por técnicas de radioinmunoensayo. La variación de PA fue significativamente menor ($p < 0.001$) en las hembras hipóxicas que en sus controles durante todo el período analizado. En los machos la

diferencia ($p < 0.001$) fue transitoria ya ya que se redujo al finalizar el estudio. La ARP no mostró diferencias significativas ni en machos (Hipóxicos (H): 6.22 ± 1.96 ng Ag I/ml plasma/h; Control (C); 6.64 ± 2.29 ng/ml/h) ni en hembras (H: 3.19 ± 1.04 ng/ml/h, C: 3.67 ± 1.24 ng/ml/h). Los niveles de aldosterona en plasma tampoco fueron estadísticamente diferentes ni en machos (H: 76.7 ± 11.9 ng/100 ml, C, 85.0 ± 11.9 ng/100 ml, C: 85.0 ± 13.4 ng/100) ni en hembras (H: 80.2 ± 11.6 ng/100 ml, C, 69.5 ± 7.2 ng/100 ml). Los resultados indican que la incidencia de hipertensión tanto en ratas macho como en hembras hipóxicas fue igual que en los controles. Sin embargo la magnitud del incremento de PA observado en ratas intactas. Contidos a HHC. El diferente comportamiento de ambos sexos coincide con la respuesta de PA observado en ratas intactas. Contrariamente no se observaron modificaciones en la ARP ni en la aldosterona plasmática por efecto de la HHC.

217

Estudios inmunológicos en neutropenias asociadas a hipogammaglobulinemia

R. A. Diez, María E. Estevez, Luisa Sen, A. Bellouard, Alicia N. Stein

Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Con el avance de los conocimientos sobre los distintos componentes de la red inmunológica se ha llegado a comprender que las anomalías de la inmunidad humoral o celular pueden depender de alteraciones cualitativas o cuantitativas en el resto de los integrantes del sistema, incluyendo mecanismos de amplificación como el complemento o las células fagocíticas. Recientemente hemos estudiado en nuestro laboratorio 3 pacientes que presentaban una asociación de neutropenia e hipogammaglobulinemia; 2 de ellos fueron niños (2 y 4 años, ambos varones) y el tercero una mujer de 35 años. En los 3 casos los estudios inmunológicos revelaron una depresión del sistema B, tanto cuantitativa (con valores porcentuales de células mononucleares con Ig de superficie entre 2.8 % y 4.7 %; en cifras absolutas entre 40 y 154/mm^3) como cualitativa (la estimulación con PWM no indujo diferenciación a células plasmáticas, detectadas por la presencia de Ig citoplasmáticas, en ninguno de los casos, con valores de diferenciación entre 0.07 % y 1 %); en cambio no se detectaron alteraciones en el sistema de linfocitos T. En el último caso estudiado (niño de 4 años), empleando técnicas adicionales se pudo evaluar la función fagocítica y lítica de macrófagos derivados de monocitos circulantes frente a levaduras (obteniéndose fagocitosis dentro del rango normal pero con alteración en la lisis, que estaba aumentada en el sistema peroxidasa dependiente y disminuida en el peroxidasa independiente, con valores de 54.5 % y 4.3 % respectivamente; para valores normales, en el mismo orden, de 14 ± 5 % y 25 ± 5 %); quimiotaxis de polimorfonucleares neutrófilos (que fue normal, con migración espontánea de 219 μ y dirigida de 1352 μ, frente a NFMP) estimulación con PHA (también normal, S.I. 52.9); el análisis de las subpoblaciones T con anticuerpos monoclonales no mostró alteraciones en la proporción entre linfocitos T "helper" y linfocitos T supresores. Dos de los pacientes estudiados se diagnosticaron inicialmente como neutropenias, en tanto que en el caso restante el primer diagnóstico fue hipogammaglobulinemia, pero en los 3 al completar el estudio se detectó la asociación simultánea de neutropenia e hipogammaglobulinemia. Esto sugiere que puede existir una relación regulatoria entre integrantes del sistema inmune inespecífico como los neutrófilos, y los elementos del sistema específico, en este caso linfocitos B; o que la asociación puede ser en realidad la expresión de un defecto global, común a ambos sistemas.

218

Clasificación de las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) con anticuerpos monoclonales y marcadores convencionales

Luisa Sen, María E. Estevez, R. A. Diez, A. Bellouard

Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Se estudiaron los blastos de médula ósea en el momento del diagnóstico de 29 pacientes con LLA. Se determinó el fenotipo celular por inmunofluorescencia indirecta empleando anticuerpos monoclonales: OKT1, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11a, Ia y J-5; simultáneamente se determinó la presencia de Ig de superficie y citoplasmáticas, actividad de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT); rosetas E 4°, 37° C y EAC. Los anticuerpos monoclonales utilizados, detectan los siguientes antígenos de membrana: T1, reconoce antígenos de timocitos maduros y linfocitos T periféricos; T3, semejante a T1; T4, reconoce una subpoblación T circulante con función "helper"; T6, identifica timocitos inmaduros; T8 reconoce linfocitos T periféricos con actividad supresora; T9 y T10 detectan células tímicas inmaduras proliferantes; Ia, reacciona con los linfocitos B, A activados y monocitos; T11a, reconoce al receptor para los glóbulos rojos de carnero y J-5 identifica al antígeno "común de la LLA". De acuerdo a la clasificación inmunológica convencional, estudiando los receptores para los glóbulos rojos de carnero (linfocitos T); presencia de Ig de superficie (linfocitos B), las LLA se dividen en: LLA-B; LLA-T; LLA noT noB (que no poseen ninguno de los 2 marcadores antes mencionados. De acuerdo a estos parámetros clasificamos las 29 LLA estudiadas en: 26 LLA noT noB; 2 LLA-T y 1 LLA-B. De las 26 LLA noT noB el 69 % expresaron el antígeno "común" de la LLA (cALLA) detectado por el monoclonal J-5, a estas LLA se las denomina LLA común y a las cALLA negativas, LLA nulas. Nosotros encontramos que dentro del grupo LLA nulo y común existe gran heterogeneidad fenotípica, pudiendo establecerse por lo menos 4 grupos diferentes. El 61 % de las $cALLA_+$ expresaron el antígeno Ia ($cALLA_+$, Ia_+) en cambio las LLA cALLA negativas en ningún caso expresaron el antígeno Ia ($cALLA^-$, Ia^-). En el subtipo de las LLA noT noB, la presencia de Ig citoplasmáticas define un grupo LLA-PreB, que según la literatura pueden ser $cALLA_+$ o cALLA negativas. Nosotros encontramos que sólo el 50 % de las LLA $cALLA_+$, Ia_+ poseían Ig citoplasmáticas ($cALLA_+$, Ia_+, Ig $cito_+$), en cambio no se detectó en ningún caso cuando el fenotipo fue $cALLA_+$, Ia^- ($cALLA_+$, Ia^-, Ig $cito^-$) o $cALLA^-$, Ia^- ($cALLA^-$, Ia^-, Ig $cito^-$). En este último grupo, se encontraron 3 de las LLA noT noB que presentaban receptor para C3 y 1 que mostró antígenos T1, 4 y 6. En antígeno tímico inmaduro T10 estuvo presente en el 87 % de todas las LLA estudiadas, en forma independiente del grupo del cual formara parte, el 70 % de las LLA fueron TdT positivas. Con respecto a las 2 LLA-T encontradas con receptores para eritrocitos de carnero, por anticuerpos monoclonales demostraron los siguientes fenotipos T1, 8, 10 y en el otro T1, 4, 8, 9, 10, en este último caso se expresó también el antígeno cALLA. La única LLA-B, mostró una monoespecifidad a cadenas pesadas u y cadenas livianas kappa y lambda con positividad para el antígeno Ia. Este estudio demuestra que es posible identificar nuevos subtipos de LLA que harán posible un diagnóstico preciso, una mejor evaluación pronóstica y por consiguiente mejores esquemas terapéuticos.

219

Caracterización fenotípica de las leucemias linfáticas crónicas (LLC) por anticuerpos monoclonales y receptores de membrana

María E. Estevez, Luisa Sen, R. A. Diez, A. Bellouard, Isabel Santos

Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Se estudiaron las características principales de las células linfoides de sangre periférica de 40 pacientes con LLC utilizando los marcadores inmunológicos tradicionales (rosetas E4° C y E37° C, *Saccharomyces*, mixtas, EAC, ratón, Ig de superficie totales, Ig citoplasmáticas totales y monoespecíficas G, M, A, D, E, kappa y lambda). Se determinó el porcentaje de receptores

para el fc de IgG y fc de IgM y en cuanto a los antígenos de membrana detectados por anticuerpos monoclonales se estudiaron el T1, T3, T4, T6, T8, T9, T10, T11a, M1, Ia, DR, S33 y T28 y se determinó además la actividad de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Los anticuerpos monoclonales producidos en hibridomas de ratón, detectan por inmunofluorescencia indirecta los siguientes antígenos de membrana: T1, reconoce los timocitos maduros y linfocitos T periféricos totales; T3, hasta el presente se describe como un antisuero semejante al T1, pero en nuestra experiencia con LLC parece no visualizar la misma subpoblación; T4, reconoce una subpoblación T circulante con función "helper"; T6, visualiza una subpoblación tímica inmadura; T8 reconoce una subpoblación T periférica con actividad supresora y T9 y T10, detectan células proliferantes tímicas inmaduras; Ia1 y DR son antisueros que reaccionan con toda la serie B, con poblaciones T activadas y monocitos; S33 es semejante a T1; T28 es semejante a T3 y M1 reconoce progenies mielomonocíticas. La actividad TdT se encuentra aumentada en células linfoides inmaduras con alto grado de capacidad mitótica. Con los marcadores convencionales, todos los pacientes estudiados mostraron fenotipo B, expresando por lo menos 1 de los 3 marcadores B tradicionales (Ig superficie, receptor para C3 y rosetas con glóbulos rojos de ratón), siendo el marcador más constante el receptor para la fracción C3 del complemento, que se visualizó en el 95 % de las LLC testadas. El 53 % expresaron receptor para glóbulos rojos de ratón; este marcador en todos los casos se encontraba acompañado de Ig sup y/o receptores para C3. El 67 % de las LLC estudiadas evidenció Ig sup que en su mayoría fueron IgM-kappa, en 2 casos IgG-lambda y en su caso IgG-kappa. Con respecto al receptor para el fc IgG empleando glóbulos rojos de buey sensibilizados, de los 7 casos estudiados, todos mostraron este receptor y sólo la mitad expresó el receptor para el fc de IgM. En 15 LLC además de los marcadores convencionales se investigó la presencia de antígenos de membrana con los anticuerpos monoclonales mencionados anteriormente. Los hallazgos importantes fueron: 8 de las 15 LLC expresaron el antígeno T1 en forma simultánea con marcadores B. De estos 8 casos, en 5 el antígeno T1 fue el único antígeno T expresado; en dos se encontraron además T4 y T8 y en un caso T8, siendo T9 y T10 negativos en todos los casos. Con respecto al antígeno Ia y DR todos fueron positivos. Ninguna de las LLC testadas expresó actividad TdT detectada por inmunofluorescencia indirecta. Este estudio demuestra que dentro de las LLC-B existe un grupo importante que comparte antígenos del sistema timodependiente-maduro. Este hecho podría explicarse como un fenotipo aberrante o la existencia en la diferenciación celular linfoide de una pequeña subpoblación con este fenotipo que hasta el presente no ha sido suficientemente caracterizada.

220

Complejos inmunes circulantes (CIC) como marcadores de tumor

Amada Segal-Eiras, María Virginia Croce, A. R. Hannois

Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

La presencia de un tumor genera en el portador nuevos determinantes antigénicos que inducen una respuesta inmune humoral y celular. Tanto los antígenos libres, los anticuerpos anti-tumor y los complejos antígeno-anticuerpo pueden ser detectados en la circulación. Los complejos inmunes circulantes (CIC) y aquellos adheridos a las células neoplásicas son los responsables de la elevada respuesta antiglobulina en pacientes con cáncer y son capaces de alterar la respuesta inmune celular anti-tumor. Este trabajo postula que la determinación de los CIC puede ser útil para evaluar a portadores de cáncer desde el punto de vista diagnóstico, pronóstico, estadío clínico y presencia de enfermedad residual. En 298 pacientes con tumores malignos, 69 con enfermedad no neoplásica y 44 individuos normales se investigaron los CIC mediante el test de combinación a Clq-^{125}I, que

ofrece elevado valor discriminativo. El valor normal se considera 11 %, o sea la medida aritmética ± 2 SD en relación al precipitado con ácido tricloroacético. Cada muestra se estudió 3-4 veces y por duplicado en cada test. Un grupo numeroso de pacientes con osteosarcoma reveló 74/108 (69 %) de valores positivos de combinación a Clq radiactivo, mientras que en sarcoma de células gigantes se observó 9/12 (75 %). En cambio los complejos inmunes resultaron negativos en 8 osteoblastomas. En cáncer de pulmón 14/42 (33 %) y en neumopatías benignas 8/38 (26 %). Pacientes con cáncer de próstata revelaron valores positivos en 10/28 (36 %) mientras que en las displasias del mismo órgano 0/9. En displasias de mama se obtuvieron 2/17 (12 %), en tanto que en cáncer de mama 72/93 (77 %). El grupo control normal reveló un solo valor positivo de 14.4 % entre 44 individuos (2 %). Para estudiar la naturaleza de los complejos inmunes se seleccionaron sueros de pacientes portadores de sarcoma osteogénico que se filtraron en columnas de Sepharose CL-4B en combinación a proteína A de estafilococo. Se demostró que la actividad intensa de combinación a Clq-^{125}I procedía de la fracción combinada y eluída con buffer glicina-HCl, pH 2.8. Por lo tanto, el anticuerpo de los complejos inmunes tiene características de IgG, ya que se combina a proteína A que como se sabe posee reactividad con la fracción Fc de la inmunoglobulina. La presencia de antígenos y anticuerpos tumor-específicos se demostró en el grupo de osteosarcoma empleando extractos de osteosarcoma humano obtenidos con KCl 3 M que se agregó en dosis progresivas al suero del paciente autólogo. Luego de incubar, se evaluaron los complejos inmunes por el test de las células Raji. Los resultados revelaron una posible especificidad de los anticuerpos a componentes expresados por el tumor. La reactividad máxima fue obtenida entre el suero y el tumor del mismo paciente pero no con extractos de diferentes tumores, o con sueros de otros pacientes o normales. Con el test de combinación a Clq radiactivo se obtuvieron valores elevados de CIC en el pre-operatorio de los pacientes, los que descendieron en el período post-quirúrgico. Se pudo observar un incremento de CIC en la recidiva y/o metástasis. Estos estudios secuenciales se efectuaron especialmente en osteosarcoma y en cáncer de mama. Los hallazgos obtenidos demuestran la utilidad que ofrece la detección de los CIC en el estudio de pacientes con tumores malignos.

221

Presencia de anticuerpos contra los retrovirus tipo B y C en el suero de pacientes con carcinoma mamario y leucemia-linfoma

Amada Segal-Eiras, María Virginia Croce, Christiane Dosne Pasqualini

Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata e Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

En el ratón, los retrovirus tipo B y C son agentes causales del carcinoma mamario y de la leucemia, respectivamente. En trabajos anteriores se demostró la presencia de anticuerpos séricos contra determinantes antigénicos del virus murino tipo C (virus de Gross) en pacientes con leucemias y linfomas. El objeto de este trabajo es investigar la presencia de anticuerpos antivirus tipo B (virus de Bittner) en el suero de enfermas con carcinoma mamario y determinar si existe coincidencia en la reacción contra ambos virus. Con este fin se obtuvieron sueros de 50 casos con carcinoma mamario en el pre-operatorio y de 92 pacientes con leucemia mieloide aguda, leucemia linfoide aguda o enfermedad de Hodgkin, todos bajo tratamiento con protocolos del GATLA (Grupo Argentino de Tratamiento para la Leucemia Aguda). Por técnica de inmunofluorescencia indirecta empleando anti-IgG humana conjugada con fluoresceína, se incubaron los distintos sueros diluidos al quinto con 4 tipos de células blanco obtenidas de ratón. De éstas, 2 presentan en su membrana determinantes antigénicos del virus de Bittner, 1) carcinoma mamario (CaS) inducido por virus en BALB, 2) timo BALB, y las otras 2,

los correspondientes al virus de Gross, 3) linfoma AKR (L15), 4) timo AKR. Sobre los blancos 1) y 2), se observó inmunofluorescencia positiva en el 62 % (31/50) y el 52 % (26/52) de los carcinomas mamarios y el 49 % (45/92) y el 19 % (18/92) de los leucemia-linfomas, respectivamente. En cambio, sobre los blancos 3) y 4) la reacción fue positiva en el 20 % (10/50) y el 12 % (6/50) de los carcinomas mamarios y el 72 % (63/88) y el 66 % (58/88) de los leucemia-linfomas, respectivamente. Los sueros humanos normales obtenidos de dadores de sangre siempre resultaron negativos sobre los 4 blancos (0/105), así como la inmunofluorescencia directa con anti-IgG humana. Estos resultados demuestran la presencia de anticuerpos en casos de cáncer de mama contra el antígeno viral asociado a esta enfermedad en el ratón o virus de Bittner. Confirman además la presencia de anticuerpos contra el virus de Gross en leucemias y enfermedad de Hodgkin, con datos similares en las 3 entidades estudiadas, razón por la cual se sumaron los datos correspondientes. El observar anticuerpos de ambos tipos en el suero de algunos de estos enfermos indicaría la posibilidad de que repliquen ambos virus simultáneamente, lo que se ha observado en el ratón y aun en líneas celulares de carcinoma mamario humano, sin poder descartar una reacción antigénica cruzada entre ambos virus. Queda por determinar si estos virus son agentes etiológicos en el hombre o sólo marcadores del tumor.

222

Distinto comportamiento cinético en citotoxicidad celular anticuerpo dependiente de diferentes subpoblaciones linfocitarias humanas

Mirta Giordano, M. Isturiz, Marta Braun

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina y CEFAPRIN, CONICET, Buenos Aires

La citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpo (CCAD) es una reacción en la cual la célula efectora reconoce los anticuerpos que recubren a la célula, bacteria o parásito a ser agredido (célula blanco) a través del receptor para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G (RFc IgG). Muchas poblaciones leucocitarias que expresan este receptor son capaces de mediar CCAD. Así, linfocitos K, polimorfonucleares, monocitos y macrófagos han sido descriptos como células efectoras del proceso. Entre los linfocitos la primera población efectora estudiada no expresaba marcadores de células B o T. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que un número bajo de linfocitos T posee RFc IgG y es activo en CCAD. Todavía no está definitivamente aclarada la composición química ni el peso molecular de los RFc IgG, pero es conocido que el estado de agregación y/o las subclases de IgG interaccionan con mayor o menor afinidad con los receptores de diferentes poblaciones celulares. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestro objetivo fue estudiar funcionalmente y en forma comparativa la actividad de los RFc IgG en linfocitos T y no T de sangre humana periférica, utilizando la CCAD como reacción indicadora de la operatividad de estos receptores. La separación de las poblaciones linfocitarias T y no T se logró incubando células mononucleares de sangre humana periférica con glóbulos rojos de carnero para permitir que los linfocitos T formen rosetas espontáneas, y centrifugando luego sobre una capa de Ficoll-Hypaque. Los eritrocitos que acompañan a las células T se lisaron con cloruro de amonio, incubándose las células 18 h a 37° C. Idéntico tratamiento recibieron los linfocitos no T. Finalmente se midió la CCAD siendo la célula blanco utilizada eritrocitos de pollo marcados con ^{51}Cr y sensibilizados con anticuerpos específicos. Los porcentajes de lisis (CCAD) se calcularon como el cociente entre las cuentas por minuto liberadas al sobrenadante y el total de cuentas ofrecido al sistema. Los resultados demostraron que cuando la reacción es completa (incubación de 18 h de células efectoras y blanco), no existen diferencias significativas en la capacidad lítica de las dos poblaciones estudiadas: Células T: 73,2 %, células no T: 68.4 % (n = 8). Sin embargo, cuando

se estudió la cinética de la reacción las células T manifestaron su actividad citotóxica en forma más lenta que las células no T, aun cuando los porcentajes finales alcanzados fueron en muchos casos superiores a los obtenidos con células no T. Los datos obtenidos son los siguientes: 30′ : T: 1.3 %; no T: 15.9 %; 60′ : T: 9.4 %; no T: 21.1 %; 120′ : T: 12.9 %; no T: 22.9 % (n = 7). Como en la suspensión celular los linfocitos T están acompañados por un número alto de células no citotóxicas que podrían dificultar por impedimento estérico la unión efector-blanco, se realizaron 3 experimentos en los cuales se agregó a la suspensión de células no T, glóbulos rojos no relacionados o linfocitos congelados y descongelados. Las diferencias en las cinéticas se mantuvieron por lo que se concluyó que se trata de una diferencia real en el mecanismo lítico de los sistemas estudiados. Estas diferencias podrían deberse a la presencia de RFc IgG de distinta afinidad sobre las células T y no T o a un mayor número de RFc IgG expresados sobre las células no T. El sistema descripto podría utilizarse además como elemento adicional de caracterización de estas poblaciones linfocitarias, separadas rutinariamente mediante la técnica de formación de rosetas espontáneas.

223

Inmunodepresión en neoplasias murinas inducidas por virus

R. A. Ruggiero, Christiane Dosne Pasqualini

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Uno de los corolarios de la teoría de la vigilancia inmunológica ha sido considerar que para el desarrollo de una neoplasia es necesario un cierto grado de inmunodepresión. En el sistema de los oncornavirus murinos fuertemente transformantes (virus Friend, Rauscher, PLLV-T2, etc.) se ha observado un profundo deterioro de la inmunidad humoral (aunque no de la inmunidad celular) en el período previo al desarrollo de la neoplasia. La capacidad inmunodepresora de estos virus ha sido estudiada con diferentes antígenos pero la mayor inmunodepresión se observó contra glóbulos rojos de carnero (GRC). En este trabajo utilizando GRC y el oncornavirus leucemógeno PLLV-T2 se trató de evaluar la relación entre inmunodepresión y neoplasia la cual no ha sido aún bien definida en este sistema. Los experimentos realizados a tal fin fueron: análisis de la inmunodepresión temprana frente a GRC, comparada con el desarrollo leucémico: 1) en distintas cepas de ratones; 2) por distintas vías de inoculación del virus. El título de anticuerpos hemaglutinantes (Ac) contra GRC se expresa como log 2 título de Ac. El desarrollo leucémico se mide por el peso de bazo de los ratones (en mg). *1)* 12 ratones BALB, 12 DBA/2 y 12 Swiss, fueron inoculados intraperitonalmente (ip) con 10^3 DL_{50} de PLLV-T2 (grupos experimentales). Los controles fueron ratones no inoculados con el virus. Cuatro días después se inoculó GRC en todos los grupos y 7 días más tarde se calculó el título de Ac contra GRC y el peso de bazo de los ratones. Resultados: *a)* grupo BALB experimental: peso bazo = 358 $\pm$ 25; log 2 título Ac = 5.75 $\pm$ 0.4. Control BALB: peso bazo = 158 $\pm$ 28 ($p < 0.001$) log 2 título Ac = 8.75 $\pm$ 0.2 ($p < 0.001$). *b)* grupo DBA experimental: peso bazo = 339 $\pm$ 28; log 2 título Ac = 10.17 $\pm$ 0.3. Control DBA: peso bazo = 184 $\pm$ 18 ($p < 0.001$); log 2 título Ac = 9.94 $\pm$ 0.3 (p = NS). *c)* grupo Swiss experimental: peso bazo = 290 $\pm$ 38; log 2 título Ac = 6.88 $\pm$ 0.4. Control Swiss: peso bazo 290 $\pm$ 23 (p = NS); log 2 título Ac = 10 $\pm$ 0.5 ($p < 0.001$). *2)* 12 ratones BALB fueron inoculados ip y 12 en el *foot pad* (fp) con 10^3 DL_{50} de PLLV-T2. 12 ratones BALB sin inocular fueron los controles. Cuatro días después se inoculó GRC ip en todos los grupos y 7 días más tarde se midió el título de Ac contra GRC y el peso de bazo de los ratones. Resultados: *a)* grupo PLLV-T2 ip: peso de bazo = 358 $\pm$ 25; log 2 título Ac = 5.75 $\pm$ 0.4. *b)* grupo PLLV-T2 fp: peso bazo = 350 $\pm$ 22; log 2 título Ac = 8.63 $\pm$ 0.3. *c)* grupo control: peso bazo = 158 $\pm$ 28; log 2 título Ac = 8.75 $\pm$ 0.2. El desarrollo leucémico entre

los grupos PLLV-T2 ip y PLLV-T2 fp es análogo ($p = NS$). A su vez la capacidad inmune fue deteriorada en el grupo PLLV-T2 ip ($p < 0.001$) pero no en el grupo PLLV-T2 fp ($p = NS$). En su forma original la teoría de la vigilancia inmunológica consideraba a la inmunidad celular como responsable de la misma. No obstante, a partir de los experimentos realizados en ratones "nude" se vio la necesidad de abandonar la teoría o buscar mecanismos inmunes alternativos que la sustentaran. En el sistema de los oncornavirus murinos muchos autores han observado una profunda depresión de la inmunidad humoral antes de la manifestación de la neoplasia, sugiriendo que en este sistema la inmunidad humoral podría cumplir el rol de vigilancia inmunológica. Sin embargo, esas investigaciones fueron realizadas casi exclusivamente en la cepa BALB siendo el virus inoculado por vía ip. En este trabajo se observa (exp 1) que hay cepas como la DBA/2 que evidencian desarrollo leucémico pero no muestran disminución de su respuesta inmune y también (exp 2) que hay vías de inoculación del virus en la propia cepa BALB (vía fp) que muestran progresión leucémica sin alteraciones en su respuesta inmune. Estos resultados no se ajustan a las predicciones de la teoría de la vigilancia inmunológica. Adicionalmente el hecho de que un agente inmunodepresor como el Endoxán inoculado 3 días antes del virus, no afecte el desarrollo de la leucemia PLLV-T2 refuerza las conclusiones anteriores.

224

Efecto de partículas de diatomeas sobre una leucemia murina de origen viral

O. D. BUSTUOABAD, R. A. RUGGIERO
CHRISTIANE DOSNE PASQUALINI

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Se conoce el efecto facilitador de la sílica sobre el desarrollo de tumores inducidos por virus. Este efecto no se modifica cuando el virus es inyectado absorbido sobre las partículas de sílice. El objeto del presente trabajo ha sido estudiar la acción de diatomeas micronizadas, que tienen sólo un 50 % de óxido de silicio y una estructura finamente cribada, sobre el desarrollo de una eritroleucemia murina de origen viral. Con tal propósito se emplearon ratones BALB/c hembras de 2 meses y se utilizó el virus PLLV-T2 (10^3 DL_{50}). El desarrollo de la leucemia se evaluó por sobrevida y ensayo de peso de bazo, expresado en mg, al día 28. Se formaron 3 grupos: grupo 1 (control) (n 24), recibió sólo el virus por vía ip el día 0. Grupo 2 (n 24), simultáneamente con el virus recibió por vía ip 5 mg de partículas de diatomea. Grupo 3 (n 24), recibió el virus absorbido previamente en 5 mg de partículas. Los resultados muestran al día 37 que, mientras en el grupo control sobrevivían el 91 % (11/12) en el grupo 2 habían muerto todos los ratones ($p < 0.001$). Cabe señalar que el grupo 3 sobrevivió hasta el día 90, es decir, 45 días más que el control ($p < 0.001$). El ensayo del peso del bazo, realizado al día 28 con la mitad de los ratones de cada grupo, demostró sólo diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los grupos 1 (1821 mg) y 3 (327 mg). En conclusión, se comprobó que las partículas de diatomeas, cuando son inoculadas simultáneamente con el virus, favorecen la acción leucemógena del PLLV-T2. Contrariamente a lo observado con la sílica, el virus absorbido a las diatomeas reduce notablemente su acción patógena. Se descartó que este efecto se deba al pH 9.2 de las diatomeas y podría atribuirse a que el virus quedaría retenido en los poros de las partículas. Debido a esta capacidad de retener y concentrar virus sería de interés utilizarlas con fines vacunantes.

225

Efecto de las partículas de diatomeas sobre el desarrollo de una leucemia singeneica en el ratón

O. D. BUSTUOABAD, J. A. GENOVESE,
CHRISTIANE DOSNE PASQUALINI

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Es conocido el efecto facilitador de la sílica sobre el crecimiento de tumores, tan-

to singeneicos como alogeneicos, en el ratón. Dicho efecto se debe a una acción tóxica sobre los macrófagos, y es más intenso cuanto mayor la concentración de sílice. Se supuso que inyectando bajas concentraciones de partículas, que tuviesen una menor proporción de óxido de silicio en su composición, se obtendría sobre los macrófagos un efecto inverso al descripto para la sílica. Para confirmar esta hipótesis, se estudió el efecto de frústulos micronizados de diatomeas, en la evolución de una leucemia singeneica de BALB/c. Las partículas de diatomeas, constituidas sólo en un 50 % por óxido de silicio, fueron suspendidas en solución fisiológica. Esta suspensión de pH 9.2, fue mantenida a 4° C sin observarse variaciones en su pH hasta el momento de su utilización. Se formaron 2 grupos experimentales, cada uno de los cuales se dividió en dos subgrupos. Los grupos 1*a* (n = 42) y 1*b* (n = 40) fueron tratados, 14 días antes de la inoculación tumoral, con 0.002 mg y 1 mg de diatomeas, respectivamente. Los grupos 2*a* (n = 44) y 2*b* (n = 48) recibieron 0.002 mg y 1 mg de diatomeas, respectivamente, en el mismo día de la inoculación tumoral. El grupo control (n = 42) recibió la dosis tumoral de 1.5×10^6 células solamente. Tanto el volumen tumoral como el número de tomas tumorales fueron significativamente menores en los tratados, especialmente en los grupos 1*a* y 2*a*, que en el grupo control. A los 15 días post-inoculación, el grupo control presentaba un 31 % (13/42) de mortalidad, contra un 10 % (4/44) del grupo 2*a* y un 3 % (1/40) del grupo 1*b*. El día 22 todos los controles habían muerto, presentando los grupos tratados los siguientes porcentajes de sobrevida: grupo 1*a*, 28 % (12/42); grupo 1*b*, 17 % (7/40); grupo 2*a*, 22 % (10/44); grupo 2*b*, 8 % (4/48). Al día 40 aún permanecían vivos el 7 % (3/42) de los ratones del grupo 1*a*, el 7 % (3/44) de 2*a*, el 5 % (2/40) de 1*b* y el 2 % (1/48) del grupo 2*b*. En conclusión, se demuestra el efecto protector de las partículas de diatomeas, inoculadas por vía intraperitoneal, para una leucemia singeneica rápidamente letal, inducida por un inóculo de un alto número de células. Se observó, de acuerdo a lo previsto, una mayor eficacia protectora de las dosis menores.

226

Infecciones virales en pacientes pediátricos con enfermedades neoplásicas

E. L. López, Noemí Rivas, S. Grinstein

Laboratorio de Virología-Serología, Hospital de Niños, Buenos Aires

Los pacientes con enfermedades malignas son más susceptibles a adquirir infecciones por varios factores, tales como: inadecuada respuesta inflamatoria, el tratamiento antineoplásico que interfiere en la inmunidad celular y humoral, la alteración de las barreras naturales de defensa y la granulocitopenia, siendo este último el más importante. Las bacterias constituyen la principal causa de infección en este grupo de pacientes, aunque los citomegalovirus, herpes virus, virus varicela-zoster, virus de hepatitis son capaces de determinar infecciones severas contraponiéndose a los adenovirus, rinovirus y enterovirus que determinan un curso de enfermedad semejante a la población sin riesgo. Se estudiaron 209 episodios de fiebre en 145 pacientes con enfermedades malignas en forma prospectiva. El rango de edades fue de 1 m a 15 años. La enfermedad de base más frecuente fue la leucemia linfoblástica aguda, 127 casos (60.7 %). Ochenta y un casos (38.7 %) ingresaron con neutropenia severa (< 500 PMF/M^3). Se pesquizó la etiología viral en 76 casos. Para ello se obtuvo de cada paciente una muestra de suero en la etapa aguda y otra en la convalescencia con el fin de detectar conversión serológica. Se utilizó la técnica de micrométodo de Sever y la metodología empleada fue: *a*) reacción de fijación de complemento para adenovirus, citomegalovirus, varicela-zoster, respiratorio sincicial y herpes virus; *b*) I. hemoaglutinación para sarmpión, y *c*) hemoaglutinación reversa pasiva y radioinmunoensayo para hepatitis B. Se consideró conversión serológica (positivos) y responsable etiológico al agente viral cuya titulación de anticuerpos fue en la convalescencia cuatro veces mayor que en la etapa aguda. Adicionalmente se realizaron estudios de anatomía patológica de las lesiones cutáneas de los pacientes con varicela y se pesquizó en esta población serología para *Micoplasma pneumoniae* por medio de la fijación de complemento.

La correlación clínica fue la siguiente: por adenovirus: 3 cuadros de infección de vías aéreas superiores, 1 caso de faringitis y 1 caso de síndrome coqueluchoso con neumonía; por *Micoplasma pneumoniae* un caso de neumonitis y 1 caso de neumonía; por herpes virus, 1 caso de síndrome mano-pie-boca, 1 caso de lesiones dérmicas vesiculosas y 1 caso de síndrome febril sin foco; por citomegalovirus 7 casos de neumopatías intersticiales y 2 casos de síndrome febril. De los 13 casos de varicela presentaron compromiso pulmonar 3 (dos de ellos con neumonitis intersticiales). De los 3 pacientes con sarampión, uno de ellos presentó un cuadro de septicemia con neumonía con derrame a *Estafilococo aureus*. Los 3 casos hepatitis B no tenían expresión clínica ni humoral de hepatitis, por lo que fueron considerados portadores, probablemente debido a las múltiples transfusiones que estos pacientes recibieron. Conclusión: En este grupo de pacientes pediátricos con infección y enfermedades malignas, las enfermedades provocadas por virus adquirieron relevancia y el pulmón fue el órgano más afectado, en algunos de ellos con importante componente intersticial y trastornos de difusión. Además esta metodología diagnóstica es incruenta y permite el diagnóstico de algunas afecciones que pueden pasar desapercibidas u originar procedimientos diagnósticos agresivos o tratamientos antibióticos no útiles.

227

Citotoxicidad celular anticuerpo dependiente: bloqueo por complejos inmunes y su recuperación funcional por factores séricos

M. A. Isturiz, Susana Fink, María Marta E. de Bracco

Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Monocitos, polimorfonucleares y dos subpoblaciones de linfocitos periféricos humanos poseen en su membrana receptores para el fragmento Fc de inmunoglobulina G (IgG). Las funciones dependientes de estos receptores son de gran importancia en fenómenos de fagocitosis, citotoxicidad celular anticuerpo dependiente (CCACD) y mecanismos de inmunoeliminación. Los complejos inmunes (CI) inhiben fácilmente in vitro todos estos mecanismos dependientes de receptores para el fragmento Fc de IgG. En enfermedades donde se detecta la presencia de CI y es esperable que las funciones dependientes de estos receptores estén totalmente inhibidas, sólo se observa una inhibición parcial. Esto puede deberse a que en el organismo existan sistemas adecuados de protección y/o limpieza de estos receptores en presencia de agentes bloqueantes. En este trabajo se muestra la acción de sueros humanos normales y deficientes en componentes de complemento sobre la actividad de la CCAD en células previamente bloqueadas por CI preformados. Los sueros utilizados fueron los siguientes: suero humano normal (SHN), suero humano con deficiencia genética absoluta del componente C_2 del sistema complemento (SH-C_2 def.), suero humano normal inactivado a 56° C 30 minutos (SHN inact.) y suero humano normal tratado con zymosán (SHN-zy). Células mononucleare de sangre periférica son incubadas con CI formados por ovoalbúmina-IgG de conejo antiovoalbúmina durante 2 horas a 37° C, luego se añaden los diferentes sueros mencionados arriba, dejándose durante 18 horas a 37° C. Después de este período, las células son lavadas exhaustivamente y se mide la CCAD utilizando como "blanco" de la reacción eritrocitos de pollo marcados con ^{51}Cr y anticuerpos antieritrocitos de pollo. La reacción se hace durante 2 horas, luego se centrifuga, se separa el sobrenadante y se mide el ^{51}Cr, que es la expresión de la actividad citolítica. Los resultados obtenidos en la CCAD ± DS después de los diferentes tratamientos fueron los siguientes: Mononucleares periféricos humanos (MPH) 58.5 % ± 2.7; MPH + CI 15.1 % ± 2.2; MPH + CI + SHN 45.2 % ± 3.7; MPH + CI + SHN inact. 18.0 % ± 4.7; MPH + CI + SH-C_2 def. 53.1 % ± 2.7; MPH + CI + SHN-zy 17.1 % ± 1.9. Considerando que SHN-zy (deplecionado de la vía alternativa, pero con actividad en la vía clásica de fijación de complemento) no tiene la capacidad de revertir la CCAD, y que SH-C_2 def. se comporta como un SHN, estos datos sugieren un rol preponderante de la vía alterna-

tiva de fijación de complemento en los mecanismos de recuperación de la actividad funcional en la CCAD de células bloqueadas por complejos inmunes.

228

Purificación de tripomastigotes sanguíneos de Trypanosoma cruzi *y marcado con isótopos radiactivos*

María Teresa Rimoldi, V. J. Katzin, Rita L. Cardoni, Stella M. González Cappa, María Marta E. de Bracco

Instituto de Investigaciones Médicas y Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Existen en la literatura varias técnicas de purificación de tripomastigotes sanguíneos, pero debido al alto contenido de contaminación con otros elementos formes de la sangre son incompatibles con la utilización de los parásitos en ensayos radioisotópicos. El propósito de este trabajo es presentar un método de purificación por medio de gradientes isopícnicos, verificación de la infectividad y marcaje con ^{51}Cr y ^{3}H-uridina de la forma tripomastigote de *T. cruzi*, cepa Tulahuen (Tc). Se utilizó sangre desfibrinada de ratones Rockland (11 ± 1 g) obtenida al 8º día post-infección (pi) con 1 x 10^6 Tc/ratón; ésta se diluyó 1/2 con ClNa 0.15 M, 1 % seroalbúmina bovina, 10 mM HEPES, pH 7 (SL) y se sedimentó a 150 g, 10 min a 4° C. El sobrenadante se centrifugó a 3000 g, 15 min a 4° C y el sedimento se ajustó a 6 x 10^7 elementos celulares/ml colocándose 0.5 ml sobre gradientes lineales de Percoll de no menos 6 cm de longitud (60 % de Percoll en SL, preformados en rotor Sorwall SS-34 a 20 000 g, 90 min a 4° C). Se centrifugó a 800 g, 15 min a 4° C en rotor de ángulo móvil. Los Tc purificados (Tc-p) (97-99 % de pureza) se ubicaron por encima de los eritrocitos e inmediatamente por debajo de los leucocitos remanentes. Se recuperó 40-50 % de los Tc totales y no se alteró la capacidad infectiva (medida por el promedio de sobrevida con 1 DL_{50}) de los Tc-p (22 ± 3 pi (n = 10)), con respecto a los Tc (21 ± 3 días pi (10)). Se intentó la marcación con ^{51}Cr in vitro de los Tc-p comprobándose que la marca se incorporó al parásito, pero no pudo ser liberada al medio por métodos fisiológicos de lisis. Se eligió ^{3}H-uridina con la cual, luego de un pulso de 2 h a 37° C (15 x 10^6 ml de SL + 20 Ci de ^{3}H-uridina) los parásitos lavados presentaron a 37° C una liberación espontánea (% Lib esp) de 13 ± 2 % (6), 28 ± 2 % (7), 39 ± 2 % (8) a las 1, 2 y 3 h, respectivamente, en medio 199.5 % SFB, 1mM HEPES y antibióticos. No varió, con este tratamiento, la infectividad de los Tc-p marcados (21 ± 2 días pi (10)). Se comprobó que el 23 % de la marca era precipitable con ácido tricloacético 5 %. A diferencia de los epimastigotes, los tripomastigotes no se lisan por complemento, en ausencia de anticuerpo, a menos que hayan sido previamente tratados con tripsina; por eso, para correlacionar lisis con liberación espontánea y muerte celular se procedió a tripsinar los Tc-p marcados (Tc-t) (15 x 10^6 Tc-p/ml + 1 mg/ml de tripsina, 15 min a 37° C), obteniéndose parásitos igualmente infestivos (Tc-t: 20 ± 2 días pi (10)). Ambos tipos de Tc (Tc-p y Tc-t) se compararon en cuanto a su susceptibilidad a la lisis osmótica con H_2O (% lisis H_2O, la lisis por complemento (% lisis C) y % Lib esp. Se observó que no había variación en el % lisis H_2O Tc-p : 51 ± 6 % (7), Tc-t : 45 ± 14 % (4); ni en % Lib esp Tc-t : 11 ± 5 % (2), 29 ± 3 % (3), 39 ± 2 % (4) a las 1, 2 y 3 h, respectivamente. En cambio, el % lisis C dio resultados significativamente mayores para Tc-t (82 ± 5 % (5)) que para Tc-p (21 ± 5 % (9)) ($p < 0.001$). Estos datos nos permitieron establecer que existe una buena correlación entre la liberación de marca al sobrenadante y la muerte del parásito medida por la desaparición de formas móviles al microscopio óptico. Por lo tanto, el método aquí presentado permite una rápida recuperación de parásitos en adecuada calidad, cantidad y pureza. Los mismos incorporan distintos isótopos, siendo la ^{3}H-uridina la marca de elección, en nuestro caso, para poderlos utilizar en técnicas citolíticas.

229

Evaluación de células con actividad supresora en sangre periférica de pacientes con tumores sólidos malignos

Marta S. García, Rosa I. Barañao, Lía Rumi
Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Ha sido demostrado que ciertas poblaciones linfoides de sangre periférica preincubada con Concanavalina A (Con A) adquieren in vitro actividad supresora y son capaces de inhibir la respuesta a ciertos antígenos, mitógenos y células alogeneicas. En el presente trabajo se trató de evaluar dicha actividad en 11 pacientes con tumores sólidos malignos, sin tratamiento específico previo a saber: 6 adenocarcinomas de mama (estadío III y IV); 2 carcinomas de cuello uterino y 4 carcinomas epidermoide de pulmón; paralelamente se estudiaron 7 controles normales. Para evidenciar la actividad supresora se realizaron cultivos autólogos de linfocitos frescos con linfocitos preincubados durante 24 horas en presencia o no de Con A. El índice de transformación blástica fue medido por la incorporación de ^{3}HTdR a las 72 horas de cultivo, evaluándose el porcentaje de supresión mediante la siguiente fórmula: 100. (1 - Δ cpm con Con A./Δ cpm sin Con A.). Los porcentajes de supresión obtenidos fueron los siguientes: Ca. de mama 50.9 ± 14.8; Ca. de útero 40.0 ± 12.0; Ca. de pulmón 10.5 ± 20.8 y controles normales: 33.4 ± 7.0. Los enfermos con Ca. de pulmón fueron estudiados después del segundo ciclo de tratamiento quimioterapéutico, observándose un porcentaje de supresión del 47.7 ± 27.6. Si bien los resultados obtenidos en los distintos grupos de enfermos estudiados no difieren significativamente de los controles. se pudieron observar porcentajes de supresión individuales superiores a la media obtenida en los sujetos normales en pacientes con Ca. de mama e inferiores en pacientes con Ca. de pulmón. Estos hallazgos nos permiten suponer que las células supresoras del tipo que puede ser activado con Con. A, no estarían implicadas de igual forma en la inmunosupresión inespecífica de pacientes con diferente patología neoplásica.

230

Efectos de la administración de progesterona y extirpación de la médula adrenal sobre los niveles de fibrinógeno plasmático en ratas con injuria tisular

J. A. Palma, A. Gavotto, S. Villagra
Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

Es conocido el hecho que la injuria tisular por laparatomía produce incremento de la síntesis de fibrinógeno plasmático (FP) en ratas, participando del mismo, entre otros factores, la hormona adrenalina. Por el contrario, la administración de progesterona (P) disminuye dicho incremento. Teniendo en cuenta que P puede deprimir la liberación de adrenalina por la médula adrenal y que la presencia de esta última hormona es necesaria para que se produzca con máxima intensidad el incremento del FP en ratas laparatomizadas (L), se estudió el papel desempeñado por la médula adrenal y la adrenalina en el descenso de FP seguido de la administración im de P (0.5 mg/día), en animales con injuria tisular. Esta última consistió en una laparatomía central posterior, con incisión de 4 cm de longitud. La extracción de la médula adrenal se realizó a través de esa incisión. 72 h después de la operación y/o administración de drogas se extrajo sangre por decapitación. Con este método de extracción, los valores de FP son equiparables a los obtenidos por otras técnicas (Collins y Baker). El FP fue dosado por el método de Ratnoff y Menzie y expresados en mg %. En el lote L el FP se elevó significativamente comparando con el grupo de ratas no injuriadas (342.2 ± 19.9 vs 212.1 ± 12.1; $p < 0.001$). Pero en el lote laparatomizado-medulectomizado bilateralmente (LMx), el FP se incrementó en menor magnitud (261.4 ± 11.3) que lo observado en el grupo L ($p < 0.01$). La administración de P descendió el FP en ratas laparatomizadas (LP) (275.1 ± 16.2) y en ratas laparatomizadas - medulectomizadas unilateralmente (LMxuP) (268.6 ± 14.7) comparando el grupo L ($p < 0.05$ y < 0.02, respectivamente). Por otra parte, el FP no se modificó cuando P se administró

en ratas laparatomizadas-medulectomizadas bilateralmente (LMxP) (253.0 ± 14.7) comparando con el grupo LMx. La administración de adrenalina (A) (0.2 mg/día) sc, no modificó el FP en ratas no injuriadas (230.0 ± 14.2). Por el contrario, en ratas medulectomizadas e inyectadas con adrenalina, el FP se incrementó a valores semejantes a los observados en el grupo L (338.4 ± 18.3). Por otra parte, P no modificó el incremento del FP propio de la laparatomía cuando fue administrado conjuntamente con adrenalina (LMxPA y LPA)(318.1 ± 14.3 y 306.8 ± 12.4, respectivamente). Con el fin de estudiar el efecto que la administración de P podría tener en ratas con secreción aumentada de adrenalina, se estudió un lote de ratas inyectadas con fisostigmina (F) (0.5 mg/kg/día) sc, droga ésta que a la dosis utilizada incrementa la secreción de adrenalina que sigue a la estimulación fisiológica del sistema simpático. En animales laparatomizados - medulectomizados bilateralmente e inyectados con P y F, el FP no se modificó (264.1 ± 12.4) comparando con el grupo LMx. Por el contrario, en el grupo laparatomizado - medulectomizado unilateralmente e inyectado con P y F el fibrinógeno se elevó significativamente (313.5 ± 11.7) comparando con el grupo LMx ($p < 0.02$). Los resultados obtenidos hacen pensar que el descenso del fibrinógeno observado en ratas laparatomizadas e inyectadas con progesterona se realizaría quizás a través de una inhibición de la secreción de adrenalina por la médula adrenal. Apoyarían esta hipótesis los siguientes hechos: 1) Progesterona desciende el fibrinógeno en los lotes con médula adrenal presente. 2) Fisostigmina eleva el fibrinógeno en el lote de ratas laparatomizadas-medulectomizadas unilateralmente e inyectadas con progesterona. 3) Progesterona no modifica el fibrinógeno en el grupo medulectomizado. 4) El descenso del fibrinógeno por progesterona no se observa cuando conjuntamente se inyecta adrenalina o se induce la secreción de ésta por fisostigmina.

231

Acción de los macrófagos humanos derivados de monocitos sobre epimastigotes de Trypanosoma cruzi

J. G. Chambó, M. Villalobos, R. Cabuli, A. Bordonava, R. P. Laguens

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Cátedra de Patología II, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata y Servicio de Cardiología del Hospital Interzonal de Agudos, General San Martín, La Plata

Con el fin de establecer si los macrófagos de humanos con enfermedad de Chagas crónica están informados contra el *T. cruzi* se estudiaron la capacidad fagocítica y citotóxica de macrófagos derivados de monocitos enfrentados con formas de cultivo del parásito. Se obtuvieron macrófagos de 52 individuos en los que el diagnóstico se realizó por la positividad de 3 de 4 reacciones serológicas. Como controles se utilizaron 38 dadores de banco de sangre. Los monocitos separados en gradientes de Ficoll-Hypaque se cultivaron en cápsulas plásticas, seleccionándolos por su capacidad de adherencia. Al cuarto día de cultivo se enfrentaron con epimastigotes de *T. cruzi*, marcados con 3-H-uridina, durante 3 horas, en una relación célula : parásito de 1 a 10. En 37 experimentos (21 chagásicos y 16 controles) se determinó la fagocitosis midiendo la radiactividad total de 10^6 células desprendidas con lidocaína, en tanto que en 41 (25 chagásicos y 16 controles) la fagocitosis se cuantificó por observación microscópica estableciéndose el porcentaje de células conteniendo parásitos. Además se realizó un estudio con macrófagos de 10 chagásicos y 8 controles enfrentados con epimastigotes opsonizados con suero anti-*T. cruzi* o con suero humano normal. La acción citotóxica de los macrófagos se estudió en 12 casos (6 chagásicos y 6 controles) determinando la radioactividad del sobrenadante libre de células y parásitos después de la incubación durante 3 horas con epimastigotes marcados con 3-H-uridina. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado. La capacidad fagocítica determinada tanto por captación de parásitos marcados con 3-H-uridina como por observación microscópica directa fue similar en los individuos chagásicos y controles. El mismo resultado se obtuvo en la determinación de acción citotóxica. La preincubación de los parásitos con suero específico aumentó significativamente la fagocitosis, pero no se observaron diferencias entre la capacidad

fagocítica de macrófagos de individuos chagásicos y sus correspondientes controles. Estas observaciones indican que los macrófagos provenientes de humanos con enfermedad de Chagas no están informados ni activados específicamente contra el *T. cruzi* y que la opsonización aumenta significativamente la fagocitosis. Además, de estos estudios se desprende que no existe una inhibición en la fagocitosis de epimastigotes de *T. cruzi* por los macrófagos de individuos chagásicos.

232

Acción de drogas tripanomicidas sobre la enfermedad de Chagas crónica del ratón

PATRICIA CABEZA MECKERT, R. J. GELPI, J. G. CHAMBÓ, R. P. LAGUENS

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Se estudió la acción de dos drogas tripanomicidas, Nifurtimox (NF) y Benznidazol (BZ) sobre la evolución electrocardiográfica, anatomopatológica y serológica de la enfermedad de Chagas crónica del ratón. Ciento noventa y ocho ratones Swiss hembras de 3 meses de edad se infectaron con 25 tripomastigotes de la cepa Tulahuen. Tres meses después se obtuvieron electrocardiogramas (ECG) y se administró a 67 animales NF (100 mg/kg/día) y 61 BZ (200 mg/kg/día) durante 30 días por vía intragástrica. Setenta ratones fueron empleados como controles recibiendo agua por la misma vía. Inmediatamente después de finalizado el tratamiento se obtuvieron ECG y se sacrificaron 48 controles, 46 tratados con NF y 43 con BZ. Los restantes animales se dejaron evolucionar durante 2 meses obteniéndose ECG a los 30 y 60 días, sacrificándose después del último ECG. Se obtuvieron muestras de corazón, músculo esquelético y colon para el estudio histológico a simple ciego, sangre para inoculación en ratón lactante y suero para la pesquisa de anticuerpos anti-*T. cruzi* por aglutinación directa. El tratamiento con las dos drogas empleadas disminuyó significativamente la incidencia e intensidad de las lesiones musculares esqueléticas e intestinales en los animales sacrificados inmediatamente después del tratamiento. La incidencia de lesiones musculares fue de 33 % (10/30) en los tratados con NF, de 18 % (4/22) en los tratados con BZ y 77 % (20-26) en los controles. La incidencia de lesiones intestinales fue de 42 % (11/26) en los no tratados, 6 % (2/30) en los tratados con NF y de 4 % (1/22) en los tratados con BZ. A los 60 días post-tratamiento la incidencia de lesiones musculares y esqueléticas fue similar. Por el contrario, la incidencia e intensidad de la miocarditis no mostró variaciones significativas. Los trastornos del ECG (QRS $>$ 0.04 seg y bloqueo AV) persistieron a los 0 y 30 días después de suspendido el tratamiento, disminuyendo en cambio significativamente a los 60 días: 31 % (8/26) en controles no tratados, 16 % (4/25) en los animales que recibieron NF y 8 % (2/25) en los tratados con BZ. En ningún grupo se observó desaparición ni disminución del título de anticuerpos anti-*T. cruzi*. La parasitemia fue negativa en los animales tratados, aislándose parásitos en los controles. Estos resultados indican que el tratamiento con 2 drogas tripanomicidas disminuye significativamente las lesiones intestinales, musculares esqueléticas y trastornos electrocardiográficos y negativiza la parasitemia. Por el contrario, no produce modificación de la cardiopatía ni disminución de los anticuerpos anti-*T. cruzi*. Los resultados obtenidos fueron similares con las dos drogas.

233

Estudio secuencial de neutropenias idiopáticas crónicas sometidas a plasmaféresis

NORA G. MONDINI, J. ZIRULNIK, A. ANDINO PAVLOVSKY, MARCELA FEJES, A. BACHMANN, AMADA SEGAL-EIRAS

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires y Departamento de Patología, Universidad Nacional de La Plata

La neutropenia idiopática crónica (NIC) reúne a aquellos pacientes que presentan un nivel de granulocitos por debajo de 2000/mm^3 de sangre por más de 3 meses. Se sabe que en algunas neutropenias de carácter autoinmune, el nivel de autoanticuerpos se encuentra elevado. Por otro lado, los complejos inmunes circulantes (CIC) se hallan aumentados en patologías malignas y en colagenopatías. Se ha descripto uniones CIC-polimorfonucleares en algunas neutropenias. Con la idea de correlacionar las NIC con la presencia de CIC y de ofrecer a estos pacientes un tratamiento alternativo, se dosó el nivel de CIC en 13 pacientes conjuntamente con un grupo control de la misma edad. Se utilizaron dos técnicas distintas: *a*) test de Clq-^{125}I parcialmente modificado, y *b*) test de precipitación con polietilenglicol (PEG) al 3.5 %. Los valores medios encontrados fueron los siguientes: 21.7 ± 4.9 y 0.43 % 0.05 para los pacientes respectivamente y 6.63 ± 1.34 y 0.22 ± 0.04 para el grupo control. Las diferencias entre pacientes y controles fueron altamente significativas con una $p < 0.005$. Se sometió a 3 de los pacientes a plasmaféresis con 4-6 recambios plasmáticos a flujo discontinuo (Haemonetics 30) de 2 litros cada vez. Se evaluaron los niveles de CIC secuencialmente y se verificó la recuperación hematológica. Los resultados fueron los siguientes: el primero de ellos, disminuyó su nivel de CIC y aumentó sus neutrófilos a partir de la primera plasmaféresis, siendo su tolerancia al procedimiento, excelente. Hasta la fecha (2 meses) se encuentra en remisión hematológica. Los otros dos, demostraron un descenso importante en los niveles de CIC coincidente con aumento neutrofílico pero debido al poco tiempo transcurrido post-plasmaféresis no se puede decir que han logrado recuperación total. En los 3 pacientes la disminución de CIC y el aumento de neutrófilos ocurrió luego del primer procedimiento. Las curvas sin embargo no fueron iguales en los 3 lo mismo que la tolerancia que en los últimos 2 presentó rush urticariano sensible a antihistamínicos orales. Consideramos que a través de este procedimiento y dado que no existe una terapia adecuada para las NIC hasta la fecha, se logra: 1) comprobar la interrelación entre los CIC y los neutrófilos; 2) proponer un nuevo esquema terapéutico para pacientes con NIC; 3) lograr un monitoreo adecuado, y 4) establecer número y frecuencia de procedimientos de plasmaféresis para cada paciente.

234

Efecto de la velocidad de crecimiento sobre parámetros hematológicos en niños

María de Carmen Morasso, María Luz P. M. de Portela, M. Cusminsky, H. Fisher

Hospital Especializado Noel H. Sbarra, La Plata y Departamento de Bromatología y Nutrición Experimental, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

En el intento de esclarecer discrepancias entre parámetros hematológicos en niños desnutridos, se realizó un estudio para valorar el efecto de la velocidad de ganancia de peso (VGP) en g/kg/d sobre la concentración de hemoglobina (Hb) g/dl, la disponibilidad de hierro (Fe) para síntesis de Hb (protoporfirinas libres en glóbulo rojo: FEP) (µg % G. R.) y sobre el tamaño de los depósitos de Fe (ferritina) (ng/ml). Fueron estudiados 37 niños, durante 60 días a intervalo quincenal con edades comprendidas entre 3 y 36 meses. Se consideró anémico al ingreso a todo niño con una concentración de Hb inferior a 11 g/dl y desnutrido a aquel con una relación peso/talla (P/T) inferior a 10 % del valor del 50 percentilo de las curvas de La Plata. Según estos criterios se integraron los siguientes grupos: "A": normales; "B": anémicos no desnutridos; "C_1": desnutridos sin deficiencia de Fe y "C_2": desnutridos con deficiencia de Fe. Los niños de los grupos B, C_1 y C_2 recibieron un suplemento de SO_4Fe equivalente a 25 mg de Fe elemental por día. El análisis de la correlación Hb/FEP demostró coherencia para los grupos A y B en tanto que los desnutridos describieron un comportamiento atípico existiendo niños con baja Hb y bajo FEP y viceversa. La relación FEP/ferritina en momento basal fue consistente en todos los grupos, es decir a menor concentración de ferri-

tina, mayor FEP intraeritrocitario. Los valores de Hb basales en los grupos A, C_1 y C_2 correlacionaron con la adecuación P/T: $r = 0.84$; $p < 0.001$ ($y = 2.37 + 0.097\ x$). Durante la evolución la relación FEP/ferritina fue influida por la VGP, fenómeno particularmente evidente en VGP superiores a 8 g/kg/d en quienes el $\bar{x}$ de ferritina fue de 74 ng/ml y el de FEP de 69 μg % G. R. Cada rango de VGP, describió una curva particular en la relación estudiada. Así un FEP de 70 correspondió a niños con VGP baja y depósitos de Fe deplecionado; a niños con VGP moderada (4-8 g/kg/d) y ferritina promedio de 45 ng/ml y a niños con VGP normal para la edad y ferritina $\bar{x}$ de 28 ng/ml. Las variaciones de tamaño de depósitos de Fe (delta ferritina) en el período total de estudio fueron influidas por la VGP: $r = -0.70$, $p < 0.001$. Los resultados indican que en niños desnutridos, la adecuación P/T, que refleja la masa demandante de 02, condiciona como fenómeno adaptativo, la concentración de Hb circulante, sin que ésta refleje el estado nutricional de Fe. La concentración de FEP y de ferritina son parámetros confiables de estado nutricional de Fe en momento basal. Las discrepancias FEP/ferritina por efecto de la VGP sugieren que a altas VGP existen deficiencias transitorias de Fe intraeritrocitario aún existiendo Fe en depósito. La dosis de Fe administrada, es insuficiente para mantener los depósitos de Fe a VGP superiores a 3.5 g/kg/d, en períodos de 60 días.

235

*Serología para la investigación de anticuerpos anti-*T. cruzi

C. Carbonetto, C. Christopoulos, S. E. Hajos, R. A. Margni, M. Esteva

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires e Instituto Fatala Chaben, Buenos Aires

En vista del diferente comportamiento biológico de las distintas poblaciones de anticuerpos de tipo IgG, y el hecho de haber demostrado previamente que en el suero de chagásicos crónicos hay incremento de anticuerpos coprecipitantes ubicados en esa clase de inmunoglobulina, se confeccionó una batería de reacciones serológicas que permitiera hacer diagnóstico diferencial. La misma estuvo integrada por inmunoprecipitación (Ouchterlony) y hemaglutinación usando glóbulos rojos de carnero y humanos sensibilizados, fijación del complemento e inmunoenzimoanálisis (ELISA). El antígeno usado en todos los casos fue el sobrenadante de centrifugación de 30 000 x g de epimastigotes lisados, conservado liofilizado (Inst. Fatala Chaben). Para hemaglutinación, el antígeno fue previamente tratado con NaCl 5M, (relación Ag/NaCl, 4: 1) a 37° C, 1 h y centrifugado a 15 000 rpm a 4° C, por 40 minutos. El sobrenadante fue dializado contra PBS por 24 horas. Para las reacciones de hemaglutinación, efectuadas en placas de acuerdo a la técnica corriente, se usaron eritrocitos humanos y de carnero, basados en el hecho del diferente comportamiento de los anticuerpos coprecipitantes y precipitantes frente a esos glóbulos rojos. Para la fijación del complemento se usó un diseño de desarrollo en placa con lectura del 50 % de lisis. El enzimoinmunoanálisis se efectuó en placas usando el método indirecto, suero antigammaglobulina humana marcada, con peroxidasa, empleando ortofenilendiamina y agua oxigenada como reveladores. Usando esta batería de reacciones se analizaron sueros de chagásicos crónicos, sueros negativos y controles. Sobre 75 sueros chagásicos analizados, la mayoría de ellos mostraron reducida capacidad precipitante o ausencia de ella, los títulos aglutinantes con GR carnero oscilaron entre 1/320 y 1/2560 sin mostrar prozona, la que sí fue bien evidente en las hemaglutinaciones con glóbulos rojos humanos. Las reacciones de fijación del complemento dieron títulos de 1/10 a 1/80, y los enzimoinmunoanálisis entre 1/256 y 1/2048. Dado que los Ac coppt no precipitan el antígeno, no fijan complemento, no aglutinan eritrocitos humanos sensibilizados y compiten por masa con los Ac ppt, los resultados obtenidos son interesantes ya que permiten demostrar que mediante reacciones serológicas que dosan ambos anticuerpos

(ELISA, hemaglutinación GR carnero) los títulos de los sueros son relativamente altos, mientras que son bajos cuando se usan reacciones que sólo identifican Ac ppt (Ouchterlony, Fijación Complemento). Es de hacer notar, además, que en las hemaglutinaciones con GR humanos, el fenómeno de prozona por competición entre ambos anticuerpos por el antígeno es bien evidente, con inhibiciones de hasta dilución 1/40. Estos resultados ponen en evidencia que para diagnóstico de Chagas no puede usarse cualquier reacción serológica, y menos hemaglutinación cualitativa con GR humanos sensibilizados, como consecuencia de los fenómenos de prozona señalados.

236

Bloqueo incompleto de rama derecha en pacientes chagásicos crónicos

N. A. VITA, F. FERREYRO, A. P. BAROUSSE

Hospital Nacional A. Posadas, Haedo

En una revisión de 270 historias clínicas de pacientes chagásicos asistidos en el Hospital A. Posadas encontramos bloqueo incompleto de rama derecha (BIRD) en un 28 %. Iniciamos entonces un estudio destinado a la detección precoz de miocardiopatía chagásica crónica subyacente. Incluimos 63 chagásicos crónicos (CH C) –21 mujeres, 42 hombres– edad promedio 33 años (menores de 50 años), con tres reacciones serológicas positivas y examen clínico, laboratorio y Rx de tórax normales, que presentaban como única alteración el BIRD en el electrocardiograma de superficie. Estudiamos como grupo control (No Ch) a 21 pacientes –10 mujeres, 11 hombres–, promedio de edad 32 años, (menores de 50 años) de idénticas condiciones, con serología negativa. Efectuamos los siguientes estudios: prueba de esfuerzo graduado, masaje de seno carotídeo durante 5 min, prueba de atropina (2 mg, ev, registro electrocardiográfico durante 30 min) y prueba de ajmalina (1 mg/kilo peso ev en 90 seg de inyección). Resultados: ergometría: 20 No CH, pruebas normales (en 8 ascenso lento de la presión arterial); en 1 No CH, reacción hipertensiva. 46 CH C, pruebas normales (en 15 ascenso lento de la presión arterial); en 17 CH C, las pruebas fueron anormales. Masaje seno carotideo: en 14 No CH fue efectivo y en 6 no, en un caso no se registró. En 29 CH C fue efectivo, en 31 no y en 3 no se registró. No observamos aumento de grado de bloqueo de rama derecha en ninguno de los dos grupos. Atropina: en CH C el promedio de latidos/min alcanzados para todo el grupo fue 110.16 latidos/min y en los No CH 114.76 latidos/min; $p = 0.126$. Ajmalina: (Valores promedios de aumento) Onda P: CH C $\bar{x}$: 17.77 mseg; No CH $\bar{y}$: 27.61 m seg; $p = 0.048$. Intervalo PR: CH C $\bar{x}$: 40.48 mseg; No CH $\bar{y}$: 49.52; $p = 0.282$. QRS: CH C $\bar{x}$: 11.79 mseg; No CH $\bar{y}$: 12.28; $p = 0.164$. QTc: CH C $\bar{x}$: 33.49; No CH $\bar{y}$: 39.52; $p = 0.191$. FC: CH C $\bar{x}$: 24.44; No CHT $\bar{y}$: 23.5; $p = 0.385$. La ergometría (interpretando el ascenso lento de la presión arterial como anormal), el MSC y la prueba de atropina, no muestran diferencias estadísticamente significativas entre CH C y No CH. La prueba de ajmalina detecta patología subyacente en el sistema de conducción, pero no permite establecer diferencias entre CH C y No CH. La única diferencia significativa fue que la onda P se prolongó más en los No CH. En conclusión, la patente de BIRD es un estadío precoz de alteraciones del sistema de conducción que puede ser puesto en evidencia mediante la prueba de ajmalina, la cual no diferencia CH C de No CH.

237

Acción de la glomérulopresina en arterias coronarias

E. DEL CASTILLO, ROSA BONETTO, EDITH ARANY, JULIA URANGA

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Este trabajo tiene por objeto investigar si la glomérulopresina puede influir en la actividad contráctil de las arterias coronarias, determinada en término de cambio de tensión y si esta acción es mediada por la síntesis de prostaglandinas. La glomérulopresina fue obtenida de la vena hepática de perros diabéticos por ultrafiltración del plasma a través de una membrana Diaflo

UM-05. Para inactivar la glomérulopresina una alícuota de ultrafiltrado se incubó con β -glucuronidasa. Se utilizaron perros normales de ambos sexos, se extrajeron las arterias coronarias y anteriores, cortándolas en tiras de 1 cm de longitud colocadas en baños de 10 ml de Krebs-Ringer bicarbonato manteniéndose a 37° C con un continuo burbujeo de una mezcla gaseosa de carbógeno. Se midieron los cambios de tensión con un transductor acoplado a un oscilógrafo inscriptor, siendo la precarga de las arterias de 1 g, las arterias se dejaron equilibrar durante 1.5 h y la tensión fue reajustada a 600 mg. La adición de 4 ml de ultrafiltrado conteniendo glomérulopresina produce una disminución de la tensión basal de -25 mg $\pm$ 3, esta respuesta es inmediata y duradera siendo anulada por la β -glucuronidasa. Cuando las arterias son tratadas con corticosterona, 3 μg/ml en la concentración final del baño, se inhibe la acción de la glomérulopresina (-6 mg $\pm$ 2) $p < 0.001$. Cuando se añade al baño indometacina con una concentración final de 10 μg/ml, se obtiene una respuesta significativamente menor (-13 mg $\pm$ 4) $p < 0.001$, lo mismo se observó con arterias tratadas con tranilcipromina cuya concentración en el baño es de 50 μg/ml se obtiene una respuesta de -12 mg $\pm$ 4, $p < 0.001$. Estos experimentos sugieren que la glomérulopresina tiene una acción relajante sobre las arterias coronarias de perro normal y que esta acción sería mediada por la síntesis de prostaglandinas.

238

Efecto de las drogas antagonistas del calcio sobre la mecánica cardíaca

H. E. Cingolani, R. J. Gelpi, Susana María Mosca, G. J. Rinaldi

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

En los últimos años se han comenzado a usar en clínica compuestos que por interferir la entrada de Ca^{++} al miocardio deprimen el inotropismo. Si bien el efecto depresor sobre la contractilidad ha sido ampliamente comprobado en experimentos in vitro, este efecto ha sido motivo de controversias al tratar de evaluarlo en organismos enteros. El presente trabajo se llevó a cabo con el objeto de estudiar en perros anestesiados con tórax abierto el efecto de tres de estas drogas: prenilamina (P), verapamil (V) y nifedipina (N) sobre la mecánica de un segmento isométrico de ventrículo izquierdo. En experimentos preliminares se determinó la dosis necesaria para disminuir en aproximadamente 30 % la tensión desarrollada (TD) de este segmento. Estas dosis fueron (por kg de peso): 2.40 mg de P, 0.46 mg de V y 0.015 mg de N. Al inyectarse estas dosis y seguir su efecto, en función del tiempo se determinó un efecto máximo a aproximadamente un minuto después de su inyección. La presión arterial disminuyó en 41 $\pm$ 3 mm Hg con P, en 36 $\pm$ 4 mm Hg con V y en 35 $\pm$ 4 mm Hg con N. El dP/dt máximo ($+\dot{P}$) disminuyó 27 $\pm$ 3 % y el $-$ dP/dt ($-\dot{P}$) 44 $\pm$ 6 % con P. Con V disminuyó el $+\dot{P}$ un 36 $\pm$ 3 % y el $-\dot{P}$ un 45 $\pm$ 6 %. Con N el $+\dot{P}$ disminuyó un 32 $\pm$ 6 % y el $-\dot{P}$ un 43 $\pm$ 6 %. El cociente $+\dot{P}/-\dot{P}$ incrementó en 0.34 $\pm$ 0.13 ($p < 0.05$) por la P, en 0.31 $\pm$ 0.08 ($p < 0.05$) por el V y en 0.32 $\pm$ 0.12 ($p < 0.05$) por la N, de valores controles de 1.10 $\pm$ 0.06, 1.15 $\pm$ 0.06 y 1.14 $\pm$ 0.07, respectivamente. Esto indicó un mayor efecto sobre la velocidad máxima de relajación. Cuando se analizaron los cocientes entre las dos máximas velocidades $+\dot{T}/-\dot{T}$, se detectó un incremento de 0.38 $\pm$ 0.14 ($p < 0.05$) para la P; de 0.30 $\pm$ 0.07 ($p < 0.05$) para el V y de 0.26 $\pm$ 0.06 ($p < 0.05$) para la N, de valores controles de 1.19 $\pm$ 0.04, 1.39 $\pm$ 0.12 y 1.34 $\pm$ 0.08, respectivamente. Esto indicó nuevamente un mayor efecto farmacológico sobre la máxima velocidad de relajación de este segmento. Se concluye que el grupo de estas drogas afecta en mayor magnitud al proceso de relajación.

239

Acción de la nifedipina sobre la relajación miocárdica

Leticia Beatriz Vittone, H. E. Cingolani

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Ha sido propuesto que la acción inotrópica negativa de las drogas antagonistas del calcio puede ser revertida por incrementar el calcio en el medio o por la acción de un agonista beta adrenérgico. Con el objeto de estudiar si esto era válido también en lo que respecta a la relajación miocárdica, se realizaron experimentos en corazones perfundidos de rata a frecuencia cardíaca y flujo coronario constantes. En estas condiciones, la actividad mecánica fue caracterizada por la cantidad de acortamiento miocárdico en el eje mayor. Esta señal fue diferenciada y se obtuvo así la máxima velocidad de acortamiento ($+\dot{L}$) y la máxima velocidad de relajación ($-\dot{L}$). La nifedipina en concentración de 5×10^{-7} M fue infundida constantemente en la circulación coronaria y produjo un efecto inotrópico negativo en $+\dot{L}$ de -46 ± 5 %. Esta dosis de nifedipina produjo una caída en $-\dot{L}$ de -58 ± 4 %. El cociente $+\dot{L}/-\dot{L}$ aumentó desde su valor control de 1.51 ± 0.08 hasta 1.96 ± 0.11 ($p < 0.001$) luego de perfundir con nifedipina, mostrando proporcionalmente mayor efecto en la relajación. Cuando el efecto inotrópico negativo de la nifedipina fue revertido por la administración simultánea de isoproterenol 5×10^{-9} M el inotropismo fue el mismo pero $-\dot{L}$ fue mayor que el control, sufriendo el cociente $+\dot{L}/-\dot{L}$ una disminución de -0.29 ± 0.09 ($p < 0.05$) respecto de su valor control. Se concluye que la nifedipina posee efecto antirrelajante y que para cancelar el efecto inotrópico negativo de la nifedipina por agonistas beta adrenérgicos, es necesario elevar los contenidos de AMPc intracelulares, los que a su vez determinan proporcionalmente una mayor velocidad máxima de relajación y una disminución del cociente entre las dos velocidades máximas.

240

Drogas antagonistas del calcio y contractilidad miocárdica

A. Garay, Alicia Mattiazzi

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

En una comunicación anterior presentamos un estudio del efecto de dos drogas denominadas "antagonistas del calcio", nifedipina (N) y prenilamina (P), sobre la tensión desarrollada (TD), la máxima velocidad de desarrollo de la tensión (+dT/dt max) y el tiempo hasta la tensión pico (TTP). En el presente trabajo se estudió, en una primera serie de experimentos, el efecto de otra de estas drogas, el verapamil (V), sobre idénticos parámetros contráctiles, comparándose la respuesta obtenida con la de las otras dos. Se utilizaron para ello preparaciones de músculo papilar de ventrículo derecho de gato, contrayéndose a frecuencia y temperatura constantes. Luego de un período de estabilización, se agregaron dosis aditivas de V hasta disminuir la contractilidad a niveles no detectables. Conjuntamente con la disminución de TD y +dT/dt max se observó una disminución significativa del TTP que fue de 94.6 ± 1.9 % del control a 10^{-7} M y alcanzó a 81.8 ± 3.5 % del control a 5.10^{-5} M. A 10^{-7} M TTP disminuyó también significativamente en presencia de P y N (95.6 ± 2.6 % y 85.6 ± 2.4 % del control, respectivamente al de P y V. Cuando los datos fueron tratados de acuerdo al método A. V. Hill (*Biochem J* 7: 471, 1913), los valores del coeficiente de Hill para +dT/dt max fueron: V: 0.45 ± 0.04; N: 1.15 ± 0.07 y P: 1.18 ± 0.09. Ha sido sugerido, por otra parte, que V no tiene efecto sobre el primer latido, luego de un período de reposo, sino sólo con la estimulación repetida. A fin de estudiar este punto, en otra serie de experimentos se midió la TD de los primeros 5 latidos luego de un período de reposo de 1½ h, en ausencia y presencia de cada una de las tres drogas. Los resultados fueron los siguientes: la TD del 1er. latido (expresada como % de la TD anterior al período de reposo) fue: control (C): 10.8 ± 3.3 %, P 5.10^{-5} M: 2.8 ± 1.7 % ($p < 0.05$); C: 36.9 ± 10.7 %, N. 5.10^{-6} M: 14.6 ± 7.8 % ($p < 0.05$); C: 23.3 ± 4.7 %, V 5.10^{-6} M: 14.5 ± 4.3 % ($p < 0.05$). En los grupos controles la TD fue aumentando en los latidos siguientes (fenómeno de la escalera). Este fenómeno no se observó en los grupos incubados con las drogas, por lo que la diferencia en TD entre los grupos controles y tratados aumen-

tó con la estimulación repetida. Estos experimentos permiten concluir que: *a)* la disminución del TTP, típica de las intervenciones inotrópicas positivas, aparece como una constante en el efecto inotrópico negativo de los antagonistas cálcicos; *b)* los valores obtenidos para el coeficiente de Hill sugieren un mecanismo de acción diferente para el V con respecto a las otras dos drogas; *c)* a pesar de que la acción de estas drogas es dependiente de la frecuencia, su efecto inotrópico negativo se hace evidente desde el primer latido, luego de un período de reposo.

241

Inducción de alteraciones cardíacas mediante la inmunización con fracciones subcelulares de Crithidia fasciculata

PATRICIA CABEZA MECKERT, J. J. CAZZULO, ELSA SEGURA, MÓNICA ESTEVA, A. M. RUIZ, J. G. CHAMBÓ, R. J. GELPI, R. P. LAGUENS

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata e INDIECH, Fatala Chaben, Buenos Aires

En un trabajo anterior se demostró que la inmunización con fracciones subcelulares de *T. cruzi* produce miocarditis y trastornos electrocardiográficos en el ratón. Con el fin de indagar si esta capacidad es compartida por otros flagelados se diseñó el siguiente experimento: *Crithidia fasciculata* desarrollada en medio de cultivo difásico se sometió a presión-descompresión obteniéndose por centrifugación del producto suspendido en sacarosa 0.25 M ClK 5 mM (SKS) tres fracciones: 5000 g, 105 000 g y sobrenadante (CS). Ratones Swiss hembras de 1 mes de edad recibieron 3 inyecciones cada 15 días por vía intraperitoneal de cada una de esas fracciones con un total de 3000 μg de proteínas por animal. Como controles se inocularon ratones con SKS, albúmica sérica y medio de cultivo. Tres meses después se obtuvieron electrocardiogramas y se sacrificaron los animales obteniéndose muestras de corazón, músculo esquelético e intestino para su estudio histológico semicuantitativo a simple ciego y sangre para titulación de anticuerpos anti-*T. cruzi* por aglutinación directa y anti-músculo esquelético y corazón murinos por inmunofluorescencia (IF). Las fracciones de 105 000 g y CS de *C. fasciculata* produjeron trastornos electrocardiográficos (QRS mayor de 0.04 sg y BAV) en 7/15 y 4/11 ratones, respectivamente. La fracción de 5000 g y los controles inyectados con SKS, albúmina sérica y medio de cultivo mostraron trastornos electrocardiográficos solamente en 5/55 animales. El músculo esquelético y colon no mostraron cambios en ninguno de los grupos. Por el contrario, en los animales inyectados con fracciones subcelulares de *C. fasciculata* se observó miocarditis circunscripta a las aurículas —5/11 en los grupos de 5000 g, 6/15 en el de 105 000 g y 3/11 en el CS—. En ningún animal de los grupos controles se observó lesiones cardíacas. En ningún lote se detectaron anticuerpos anti-*T. cruzi.* El estudio por IF mostró anticuerpos anti-miocardio y músculo esquelético, con disposición sarcolemal, miofibrilar o discriminador entre fibras de contracción lenta y rápida en los lotes de 5000 y 105 000 g, absorbibles con *C. fasciculata.* Estos resultados indican que, a semejanza de lo que sucede con el *T. cruzi,* la inmunización con fracciones subcelulares de *C. fasciculata* es capaz de producir daño cardíaco, coincidentemente con la presencia de anticuerpos circulantes anti-músculo estriado.

242

Complejos inmunes circulantes en valvulopatías

A. TETTAMANZI, S. AZCONA, MARCELA FEJES, A. BACHMANN, AMADA SEGAL-EIRAS

Instituto de Investigaciones Hematológicas y Fundación de Cardiología H. Pombo, Academia Nacional de Medicina y Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

La posibilidad de distinguir entre endocarditis bacterianas (EB) y septicemias sin localización endocárdica, es importante desde el punto de vista del pronóstico y del tratamiento de los pacientes sometidos a cirugía cardíaca. Se sabe que pacientes portadores de EB revelan niveles de complejos inmunes circulantes (CIC) significativamente mayores que aquellos con septicemias no endocárdicas. En esta comunicación se presentan datos preliminares de un intento de correlacionar el cuadro clí-

nico y los parámetros hematológicos con el nivel de complejos inmunes circulantes en pacientes con recambios valvulares. Se realizó un estudio prospectivo de 8 pacientes valorando los parámetros mencionados con muestras pre-operatorias y seriadas post-operatorias (48 y 72 h, una semana, dos semanas, un mes, dos meses). Las determinaciones de CIC se realizaron en los sueros de los pacientes con dos técnicas: *a)* test de precipitación con polietilenglicol al 3.5 % y *b)* test Clq-^{125}I parcialmente modificado. De los 8 pacientes, 4 desarrollaron EB en el post-operatorio alejado Esta se vio acompañada de fiebre, recuentos de blancos y eritrosedimentación altos y hemocultivos positivos. Los niveles de CIC en todos ellos fueron elevados (media PEG: 9.66 ± 0.15) (media Clq-^{125}I = 22.67 ± 3.30). La remisión clínica fue acompañada por un descenso de CIC a niveles normales (media PEG 0.22 ± 0.04 y media Clq-^{125}I : 6.63 ± 1.34), en aquellos casos que se recuperaron (2). En los que la sepsis progresó, los CIC se mantuvieron elevados hasta la muerte. En aquellos pacientes que no cursaron con EB, se notó que los CIC se elevaron levemente, coincidiendo este aumento con los picos febriles post-operatorios pero regresaron a la normalidad en la medida que desaparecieron los síntomas mencionados. Consideramos que un aumento significativo en el número de pacientes nos dará conclusiones más definitivas, pero hasta el momento podemos sugerir que: *a)* Se confirma la relación que existe entre EB y CIC. *b)* Una curva de dosaje de inmunocomplejos en las EB es un buen parámetro para valorar el efecto del tratamiento seguido. *c)* Existe una relación entre hipertermia y aumento de inmunocomplejos circulantes dado que al aparecer síndromes febriles se notó un aumento de CIC y que en aquellos que no tuvieron EB, los valores de CIC descendieron a valores normales al recuperarse clínicamente.

243

Influencia de la dieta hiposódica y el propranolol en la hipertensión renal experimental

A. Gallo, C. M. Taquini, María Fontán, Nidia Basso, A. C. Taquini

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Con el objeto de valorar la participación del sodio (Na) y del propranolol (Pro) en la hipertensión renal experimental 1 riñón 1 clip se tomaron tres grupos de ratas: Grupo I, control (n = 10), al que se le administró dieta normal (Purina) y agua de la canilla, Grupo II (n = 10) al que se sometió a dieta hiposódica y agua destilada desde 10 días previos a la experiencia hasta su finalización, Grupo III (n = 10) al que se le administró dieta normal y agua de la canilla a la que se agregó 100 mg/kg/día de Pro a partir del décimo día. A todos los animales se les practicó nefrectomía derecha y 10 días después se les implantó un clip de plata de 0.25 mm de diámetro interno en la arteria renal izquierda, se les midió la presión arterial (PA), la frecuencia cardíaca (FC), la actividad renínica plasmática (ARP) ngAI/ml/h, la excreción de sodio (U_vNa) (mEq/kg/24 h) el hematocrito (Htc), la creatinemia (cr), durante el período control, después de la nefrectomía y a los 5, 10, 20 y 30 días del clip. Además en el Grupo III se determinó la concentración plasmática de Pro (ng/ml). En el Grupo control 5 días después del clip la incidencia de hipertensión fue de 53.8 % con $\bar{x}$ 160 ± 21 mientras que a los 10 días fue de 89 % con $\bar{x}$ de 163 ± 504. Sólo 3 ratas hipertensas sobrevivieron a los 20 y 30 días ($\bar{x}$ 171 ± 7.5 y 196 ± 7.2). La ARP control fue de 6.04 ± 0.71 y en los tres animales hipertensos que sobrevivieron aumentó a los 5 días a 24.25 ± 13.42 para luego descender a 13.89 ± 5.47, 6.36 ± 2.72, y 5.27 ± 2.22 a los 10, 20 y 30 días del clip. El U_vNa aumentó a los 10 días del clip en estos animales de 7.48 ± 0.49 a 9.47 ± 0.36 ($p < 0.01$) para luego descender a los 20 días a 2.53 ± 1.57 ($p < 0.01$) y a los 30 a 1.47 ± 0.60. La Cr y el Htc de todos los animales se mantuvo dentro de lo normal. En el Grupo II a los 5 días del clip hubo una incidencia de hipertensos del 50 % ($\bar{x}$ 152 ± 464) mientras que a los 10 era de 66 % ($\bar{x}$ 154 ± 3.54) y a los 20 era del 90 % de los animales ($\bar{x}$ 162 ± 9.24). La ARP control de

este grupo fue de 11.63 ± 1.65, no varió con la nefrectomía, y a los 5 días del clip aumentó en 4 de los 5 hipertensos ($\bar{x}$ 20.14 ± 5.40) (NS) para luego descender a los 10 y 30 días a valores de 11.20 ± 1.88 y 12 ± 1.67. El U_vNa no mostró variaciones con respecto al control ($\bar{x}$ 0.036 ± 0.018) ni en normotensos ni en hipertensos. Un solo animal elevó su Cr (3.) en el día 30 y los Htc fueron normales. En 7 animales la administración de Captopril 80 mg/kg/día en dos dosis diarias disminuyó la PA en 6 de ellos a valores controles (116 ± 2) dentro de las primeras 12 h. El Grupo III mostró una disminución de la incidencia de hipertensión, ya que a los 5 días sólo un animal había elevado su PA mientras que a los 10 y 20 días la incidencia fue del 33 % y 44 % con cifras de ($\bar{x}$ de 171 ± 18.8 y 185 ± 16.5). La ARP disminuyó con el tratamiento en 5.34 ± 1.08 ($p < 0.01$) con tendencia a aumentar a los 5 días del clip tanto en normotensos (10.5 ± 2.68) (NS) como en la hipertensa (21.82). El U_vNa control fue de 9.28 ± 0.45 sin que haya modificaciones en las ratas normotensas o hipertensas a los 10 días del clip. La Cr y el Htc fueron normales. Los resultados permiten concluir: *a)* que la dieta hiposódica crónica no previene el desarrollo de la hipertensión en este modelo; *b)* que la hipertensión no pareciera estar vinculada a la retención de sodio, ni tampoco al sistema renina angiotensina, en animales con dieta hiposódica crónica, aun cuando el Captopril es capaz de retornar los valores de PA a valores controles; *c)* que en los animales controles pareciera haber una primera etapa renínica y luego la retención de sodio intervendría en el mantenimiento de la hipertensión; *d)* que el propranolol retrasa la aparición de hipertensión y posiblemente previene su desarrollo en un porcentaje de casos; retardo que no parecería estar vinculado al bloqueo de la liberación de renina.

244

Coleresis inducida por Nifurtimox en la rata

MARTA DUBIN, SILVIA N. J. MORENO, R. DOCAMPO, A. O. M. STOPPANI

Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El Nifurtimox, un derivado nitrofurano, es una de las drogas más efectivas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. La influencia de esta droga sobre la secreción biliar es desconocida. El objetivo del presente estudio ha sido investigar el efecto de la administración de Nifurtimox sobre las diferentes fracciones de la bilis, en la rata. El flujo biliar y el flujo de ácidos biliares han sido determinados en ratas que recibieron, por vía intraperitoneal: *a)* Nifurtimox [10 mg/100 g de peso corporal (pc)]; *b)* Nifurtimox (20 mg/100 g pc); *c)* Tween 80, ClNa 0.15 M (1 : 24 v/v) (controles). Se observó que: 1) el flujo biliar fue significativamente más elevado en los animales a los que se les administró Nifurtimox a la dosis de 10 mg/100 g pc que en los controles (9.46 ± DS 1.19 μl/min/100 g y 8.06 ± DS 0.59 μl/min/100 g, $p < 0.05$, respectivamente); 2) el flujo biliar fue significativamente más elevado en los animales a los que se les administró Nifurtimox a las dosis de 20 mg/100 g pc que en los controles (11.95 ± DS 1.72 μl/min/100 g y 9.23 ± DS 1.60 μl/min/100 g, $p < 0.001$, respectivamente); 3) la depuración de eritritol $|^{14}C|$ aumentó en forma paralela el flujo biliar, indicando esta observación que el incremento de la coleresis debido al Nifurtimox es de origen canalicular; 4) la secreción de ácidos biliares no fue significativamente modificada por el tratamiento con Nifurtimox, a ninguna de las dosis utilizadas. El análisis espectral de la bilis de los animales tratados con Nifurtimox, obtenida durante los 150 min después de una inyección única intraperitoneal de 10 y 20 mg/100 g pc, reveló absorciones máximas en las zonas de 296 y 415 nm, atribuibles a la excreción biliar de Nifurtimox y/o sus metabolitos. En conclusión, el aumento en el flujo biliar producido por la administración de Nifurtimox es debido a un incremento en la producción canalicular, no parece ser debido a un incremento en la excreción de ácidos biliares, sino atribuido a un aumento en la "fracción de la secreción biliar no dependiente de las sales biliares".

245

Estudio comparativo de la respuesta inmune humoral autóloga, isóloga y heteróloga a antígenos de glándulas accesorias sexuales de rata

MARÍA C. PISTORESI DE PALENCIA, MIRIAN C. GALMARINI, CLELIA M. RIERA, ELSA V. DE CIMA

Cátedra de Inmunología y Serología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

En trabajos anteriores se ha demostrado que ratas macho y hembra albino endocriadas, inmunizadas con extracto de glándulas accesorias sexuales masculinas de rata (GA) químicamente modificado, responden con gran heterogeneidad de anticuerpos: hemaglutinantes, no-hemaglutinantes, precipitantes y detectados por inmunofluorescencia. El examen de las glándulas accesorias de ratas macho tratadas permitió detectar anticuerpos depositados como también lesión histológica. El propósito de este trabajo fue analizar comparativamente la respuesta inmune humoral autóloga, inducida en ratas macho (12 animales) con la isóloga obtenida en hembras (11 animales) y la heteróloga en una cabra y un conejo inmunizados con glándulas accesorias químicamente modificada y emulsionada en adyuvante de Freund incompleto, fortificado con 8 mg/ml de *M. tuberculosis.* El estudio de anticuerpos se realizó mediante hemaglutinación pasiva (HP) e inmunodifusión radial doble (ID RD), utilizando como material antigénico GA, las tres fracciones principales de PA obtenidas por cromatografía en Sephadex G-100 y la fracción Sephadex G-100 que contiene el autoantígeno (FI) tratada con tripsina. Utilizando GA como antígeno la HP reveló títulos semejantes de anticuerpos en ratas macho y hembra oscilando en ambos lotes entre 1/243 y 1/6561 y títulos de 1/59049 en conejo y 1/531441 en cabra. Por IDRD se detectaron anticuerpos precipitantes en 2 de 12 ratas macho, en 7 de 11 hembras y en los animales heterólogos inmunizados. En todos los estudios realizados los sueros obtenidos preinmunización dieron resultados negativos. La HP e IDRD realizadas con las tres fracciones de GA obtenidas por Sephadex G-100, permitieron observar que mientras los sueros de machos sólo reaccionaron con FI, los sueros de hembras y heterólogos lo hicieron con las tres fracciones ensayadas. La FI ensayada por IDRD detectó en sueros de rata de ambos sexos un anticuerpo de igual especificidad y en hembras otro anticuerpo adicional. Para estudiar más analíticamente las diferencias en la especificidad de la respuesta humoral obtenida en ratas macho y hembra se realizó la digestión enzimática de FI con tripsina, con el fin de exponer nuevos epitopes. Este tratamiento anuló sólo la línea de precipitación correspondiente al antígeno inmunogénico en ambos sexos (autoantígeno). Resumiendo, en la mezcla heterogénea de macromoléculas órgano específica presentes en GA, varias fueron inmunogénicas en la inmunización heteróloga, por lo menos dos de ellas en hembras y sólo una de las mismas en machos, en las condiciones experimentales de este trabajo. Esta última macromolécula más inmunogénica fue sensible al tratamiento con tripsina. El tratamiento enzimático realizado no permitió ampliar la información respecto a diferencias en la especificidad a nivel de fragmentos de moléculas ya que anuló totalmente la capacidad del autoantígeno de precipitar con la población de anticuerpos inducidos en machos y hembras.

246

Caracterización físico-química e inmunoquímica parcial de un autoantígeno de glándulas accesorias sexuales masculinas de rata

SUSANA PESOA, MIRIAN GALMARINI, ELSA V. DE CIMA, CLELIA M. RIERA

Cátedra de Inmunología y Serología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Un autoantígeno involucrado en la respuesta autoinmune de ratas macho albino endocriadas inyectadas con extracto salino de glándulas accesorias químicamente modificado, fue purificado mediante cromatografía de afinidad, empleando Sepharosa 4B-IgG de rata anti glándulas accesorias.

La fracción purificada, fue capaz de inhibir la reacción de hemaglutinación de células tanadas entre autoantisuero y hematíes sensibilizados con extracto salino de glándulas accesorias. Determinada su capacidad autoantigénica in vitro, se procedió a su caracterización. La pureza del autoantígeno se controló mediante ensayos de inmunodifusión radial doble, frente a suero de cabra anti glándulas accesorias de rata, obteniéndose una única banda de precipitación. Esta banda dio reacción de identidad con la obtenida entre la fracción purificada y un autoantisuero. Por otra parte, el autoantígeno purificado mostró dos componentes proteicos cuando fue sometido a estudios de electroforesis en gel de poliacrilamida común en concentraciones que variaron de 20-80 μg. Empleando electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes, con SDS y 2 mercaptoetanol, se observó una única banda proteica en un rango de concentraciones similar al anterior. Mediante esta última metodología y corriendo en paralelo marcadores de peso molecular se determinó que el peso molecular del autoantígeno es de aproximadamente 78 k. Estos ensayos indicarían que el autoantígeno purificado presenta heterogeneidad en la densidad de carga y homogeneidad de peso molecular. Se demostró que el autoantígeno se encuentra en la fracción sobrenadante 105 000 g de extracto salino de glándulas accesorias, por lo que se supone formaría parte de la fracción citosólica del mismo. Otra característica del autoantígeno, demostrada mediante la inmunización de un lote de 10 ratas es que el mismo es inmunogénico y patogénicamente activo en dosis del rango de los microgramos. Siete ratas recibieron durante el curso de la inmunización dos dosis de 1 μg de autoantígeno y 7 días antes de ser sacrificadas una dosis refuerzo de 25 μg. En todos los animales se detectó hipersensibilidad demorada y presencia de células mononucleares en el órgano blanco, no detectándose respuesta inmune humoral. Los tres animales restantes recibieron tres dosis de 5 μg cada una, observándose en dos de ellos respuesta humoral e infiltración de polimorfonucleares en las glándulas accesorias.

247

Especificidad de la supresión obtenida por Ciclofosfamida (CY) en autoinmunidad experimental inducida en ratas

H. Serra, Mirian Galmarini, Elsa V. de Cima, Clelia M. Riera

Cátedra de Inmunología y Serología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

La respuesta autoinmune humoral contra glándulas accesorias sexuales masculinas de rata químicamente modificadas (GAM) fue suprimida mediante la inyección de una dosis única de CY (100 mg/kg) 3 días posteriores a la primera sensibilización (Post CY). Por el contrario, la respuesta inmune humoral no fue afectada cuando la droga se utilizó previamente a la sensibilización. A fin de demostrar la especificidad y el probable mecanismo de la supresión inducida en los animales Post CY se realizaron las siguientes experiencias. 18 ratas macho y hembra albino endocriadas recibieron intradérmicamente el material sensibilizante, GAM, emulsionado en coadyuvante de Freund completo, 3 días previos a la inyección de CY. Coincidiendo con la segunda inmunización de GAM, realizada a los 30 días, los animales fueron inmunizados con dos antígenos no relacionados (9 ratas recibieron glóbulos rojos de carnero, GRC, y 9 IgG humana agregada). Los anticuerpos contra GAM e IgG humana fueron detectados mediante técnicas de aglutinación pasiva y los anticuerpos contra GRC por aglutinación directa. Los estudios se realizaron 15 días posteriores a la última inmunización. Todos los animales respondieron con anticuerpos en títulos $\geq$ 1/5 al antígeno inmunizante no relacionado y ninguno de ellos lo hizo frente a GAM. Un grupo control (8 ratas) inmunizado como el grupo en estudio y no tratado con CY, respondió con títulos similares para los heteroantígenos y títulos $\geq$ 1/81 para GAM. Estos resultados indican que la supresión inducida es específica. Con el objeto de estudiar el posible mecanismo del fenómeno observado se realizaron experiencias de transferencia. Para ello, en un experimento piloto 10 ratas recibieron

células de bazo (8 × 10^{-7}/ml) obtenidas de animales Post CY a los 15 días de la primera inmunización, un día después fueron inmunizados intradérmicamente con GAM e IgP humana agregada emulsionados en coadyuvante de Freund completo. Los estudios de inmunidad humoral realizados 30 días posteriores a la transferencia mostraron actividad de anticuerpos contra GAM en títulos ≤ 1/9, mientras que los animales del grupo control respondieron con títulos ≥ 1/81. La capacidad para desarrollar anticuerpos contra IgG humana fue similar en ambos grupos. Los estudios de transferencia confirmaron la especificidad de la supresión y orientarían a afirmar que la misma no se debería exclusivamente a una eliminación clonal sino que también podría estar involucrada la participación de células supresoras.

— — — —

Only objective knowledge is criticizable; subjective knowledge becomes criticizable only when it becomes objective. And it becomes objective when we say what we think; and even more so when we write it down, or print it.

Sólo el conocimiento objetivo es criticable; el conocimiento subjetivo se vuelve criticable solamente cuando se torna objetivo. Y se convierte en objetivo cuando decimos lo que pensamos; y aun más cuando lo escribimos o lo imprimimos.

KARL R. POPPER

Objective knowledge. Clarendon Press, Oxford, 1972

ISSN 0025-7680

MEDICINA (Buenos Aires) 41: 815-821 (1981)

RECEPTORES DE LAS MEMBRANAS SINAPTICAS.

LOCALIZACION Y PROPIEDADES *

EDUARDO DE ROBERTIS **

Instituto de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La clásica transmisión sináptica química implica que entre los componentes pre- y postsinápticos se interpone un mecanismo químico que amplifica la señal eléctrica. Este mecanismo comprende: *a*) el neurotransmisor, acumulado dentro de las vesículas sinápticas de la terminación nerviosa [8], el cual es liberado a la llegada del impulso nervioso, y *b*) el receptor, una proteína que interactúa específicamente con el neurotransmisor. Se piensa que esta interacción produce un cambio conformacional que inicia una serie de fenómenos que dan como resultado la translocación de iones a través de canales o ionóforos con el correspondiente cambio en potencial de membrana. Otras consecuencias de la interacción pueden ser el desplazamiento de Ca^{2+}, la activación de adenylato o guanilato ciclasa y otros fenómenos metabólicos. Una idea de la enorme amplificación que puede alcanzarse en la transmisión química la da el hecho que una o dos moléculas de acetilcolina pueden producir la translocación de 50 000 iones monovalentes en la unión mioneural [10]. La Figura 1 representa un modelo de receptor y del posible mecanismo de acción del neurotransmisor en la transmisión colinérgica.

Hasta hace pocos años el conocimiento sobre los receptores sinápticos era principalmente indirecto; se basaba en la respuesta final producida; por ejemplo, la contracción o relajación de un músculo, la secreción de una glándula, la activación o inhibición de una neurona, etc. Más recientemente, gracias al aislamiento de las membranas celulares y de algunos receptores como entidades bioquímicas, ha sido posible estudiar la interacción primaria neurotransmisor-receptor. Así, se ha demostrado que las proteínas receptoras y los ionóforos se encuentran integrando la estructura de la membrana y se caracterizan por ser altamente hidrofóbicas por lo que su aislamiento requiere el uso de detergentes o de solventes orgánicos (véase De Robertis [6]).

Características de la interacción

La interacción del neurotransmisor con los receptores de membrana presentan varias características que es necesario reconocer. Mediante técnicas de fijación de drogas radioactivas a la membrana se pueden demostrar varias de las propiedades fundamentales de los receptores. Son éstas:

1. *Saturabilidad:* dado que el número de sitios receptores es finito la curva que representa la interacción ligando-receptor debe ser saturable (B_{max}).

----

* Presentado como Conferencia Alfredo Patalano durante la XXVI Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, en Mar del Plata, el 9 de Noviembre de 1981.

** Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Dirección postal: Instituto de Biología Celular, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina.

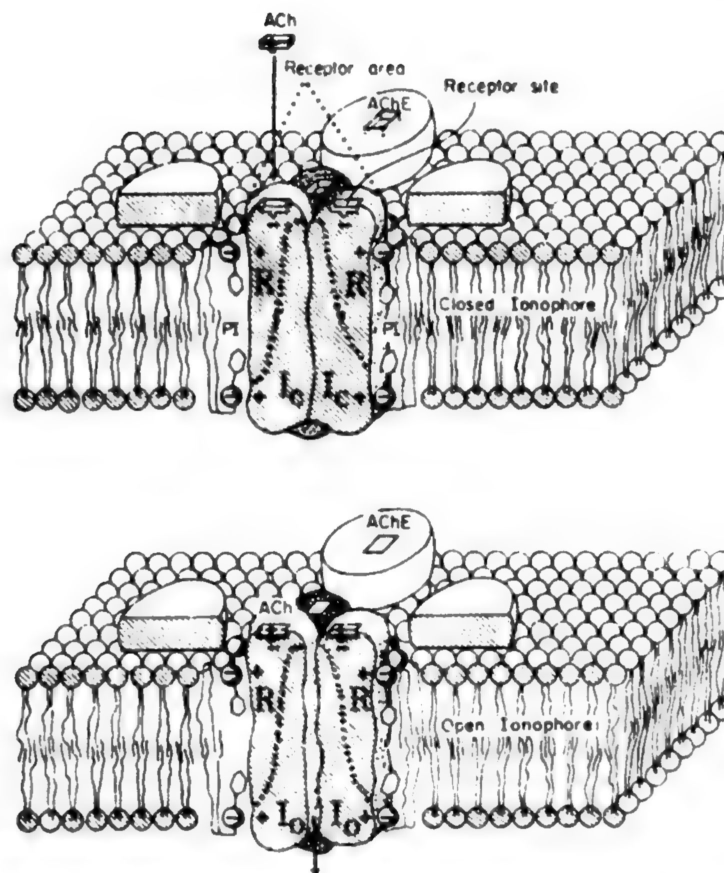


Fig. 1. — Modelo oligomérico del receptor colinérgico propuesto por De Robertis en 1971. ACh, acetilcolina; AChE acetilcolinestarasa, PI, fosfatidilinositol; R proteína receptora; Ic ionóforo cerrado; Io, ionóforo abierto. Tanto el receptor como el ionóforo son proteínas hidrofóbicas intrínsecas de la membrana.

2. *Reversibilidad:* la interacción, en general, no es de tipo covalente y, por lo tanto, debe ser reversible.

3. *Afinidad:* cuanto mayor es la afinidad la fijación del ligando es más fuerte y, por lo tanto, más difícil de desplazar. La afinidad se expresa por la constante de disociación (K_D) obtenida por equilibrio o por estudios cinéticos (K_{Dc}):

$$K_{D_c} = \frac{K_{-1}}{K_{+2}}$$

donde K_{-1} constante de disociación y K_{+1} constante de asociación).

4. *Especificidad:* la interacción debe ser específica, es decir comportarse de la misma manera que en condiciones fisiológicas o farmacológicas en el organismo o el tejido cuando se utilizan agonistas o antagonistas. La especificidad puede llegar a ser aún de tipo estérico, es decir ser preferente o absoluta para uno de los isómeros ópticos (por ejemplo L-noradrenalina).

Recientemente con Aguilar y Salas [3] hemos estudiado el receptor colinérgico muscarínico de la corteza cerebral de la rata utilizando como ligando específico el L-quinuclidinil benzilato (L-QNB-H^3). En este estudio los datos experimentales obtenidos se analizaron por computación utilizando modelos para 1, 2 y 3 sitios heterogéneos y también para sitios cooperativos bivalentes. Se observó que la curva teórica para dos poblaciones era la que mejor se adecuaba a los datos. La heterogeneidad de los sitios también se demostró mediante estudios cinéticos de asociación y disociación y la especificidad mediante el uso de agonistas y antagonistas específicos. La Tabla 1 resume algu-

TABLA 1. — *Resumen de los datos obtenidos en la fijación de quinuclidinil benzilato —H^3 a las membranas sinaptosomales de la corteza de rata.*

	Sitio I	Sitio II
Constantes de disociación por equilibrio	$K_{D_1} = 5{,}2$ pM	$K_{D_2} = 144$ pm
Constantes de disociación	$k_{-1} = 4{,}8 \times 10^{-3}\ min^{-1}$	$k_{-2} = 37{,}7 \times 10^{-3}\ min^{-1}$
Constantes de asociación	$k_{+1} = 4{,}9 \times 10^{-4}\ mol^{-1}\ mm^{-1}$	$k_{+2} = 1{,}1 \times 10^{-4}\ pmol^{-1}\ min^{-1}$
Constantes cinéticas	$K_{D_{c_1}} = 9{,}7$ pM	$K_{D_{c_2}} = 342$ pm
$\frac{K_{D_c}}{K_D}$	1,8	2,3

nos de los datos obtenidos en este estudio.

Este ejemplo, presentado aquí en forma muy resumida, ilustra sobre las diversas características de la interacción ligando-receptor y de los datos cuantitativos que deben obtenerse para demostrar de que se trata de un fenómeno específico. También demuestra que el uso de programas de computación puede ser de suma utilidad para definir mejor las propiedades de la interacción ligando-receptor a nivel de la membrana o del receptor aislado.

Localización pre y postsináptica de los receptores. Importancia médica.

El segundo punto de esta conferencia se refiere a la localización de los receptores en relación con las membranas sinápticas. Hasta hace relativamente poco tiempo sólo se conocían los receptores post-sinápticos, es decir aquellos que producen los efectos antes mencionados sobre la célula efectora. Sin embargo, el hecho de que la membrana neuronal es continua y además fluida permitía suponer que los receptores pudiesen encontrarse en otras partes de la superficie de las neuronas. En la actualidad se reconoce que, además de su preferente localización post-sináptica, existen receptores localizados a nivel de la membrana del terminal pre-sináptico y que estos receptores tienen un papel fundamental en la regulación de la liberación del neurotransmisor. Otro concepto importante es que una neurona, aunque en general produce un solo neurotransmisor (hay sin embargo excepciones), puede tener en su superficie una multiplicidad de receptores. Esto le permite al sistema nervioso tener un más alto grado de complejidad funcional.

Uno de los primeros experimentos que sugirieron la existencia de receptores presinápticos fue el realizado por Brown y Guillespie en 1957. Ellos observaron que la liberación de noradrenalina del bazo, por estimulación del nervio esplénico, aumentaba cuando se agregaba al medio fenoxibenzamina. El mecanismo de este fenómeno sólo pudo aclararse en 1971, cuando Langer en Argentina y Starke en Alemania Federal repitieron estos experimentos luego de marcar el neurotransmisor con noradrenalina radioactiva (véase Langer)[11].

Se observó que cuando, por la estimulación del nervio, se alcanza una cierta concentración de noradrenalina en el espacio sináptico, hay un efecto inhibitorio de retroalimentación *(negative feedback)* que reduce la secreción del neurotransmisor. Por otra parte, cuando se bloquean los receptores α-adrenérgicos con la fenoxibenzamina, se interfiere con el mecanismo inhibitorio presináptico y se aumenta la liberación de la noradrenalina.

Aunque se conocen más los mecanismos de regulación presináptica en el sistema nervioso periférico se ha demostrado que los mismos existen en sinapsis centrales. Por ejemplo en cortes de cerebro, Szerb y Somogy[16] demostraron que la liberación de acetilcolina está regulada por receptores presinápticos de naturaleza muscarínica.

En los últimos años, en colaboración con Aguilar y Criado [1, 2, 5], hemos aplicado un enfoque estructural al problema de la localización pre y postsináptica de los receptores. Este estudio se basó en investigaciones anteriores en las cuales, luego de aislar el sinaptosoma y la membrana sinaptosomal mediante la acción de detergentes, pudimos disolver la mayor parte de la membrana presináptica [7]. Esto puede verse en la Figura 2, para el caso del receptor opiáceo, marcado con naloxona – H^3. Utilizando mayores concentraciones de detergente y un tratamiento más drástico [4] se pudo también eliminar la membrana postsináptica. Los resultados obtenidos con esta disección sistemática de la región sináptica en el caso de los receptores muscarínicos, α-adrenérgicos y opiáceos sugieren que existen tantos receptores pre- como postsinápticos dopaminérgicos, benzodiazepínicos. La Figura 3 muestra la existencia de receptores opiáceos pre y postsinápticos marcados con naloxona – H^3. En contraste con estos resultados, los receptores nicotínicos mostraron una preferente localización postsináptica [1].

Para el estudio de la localización de los receptores se pueden utilizar también otros métodos basados en la acción de lesiones de ciertos núcleos o trayectos nerviosos que inervan regiones determinadas del cerebro. También se pueden usar agentes neurotóxicos que destruyen neuronas o ciertas vías en forma específica. Estos métodos tienen el inconveniente de que pueden producir supersensibilidad de los receptores postsinápticos.

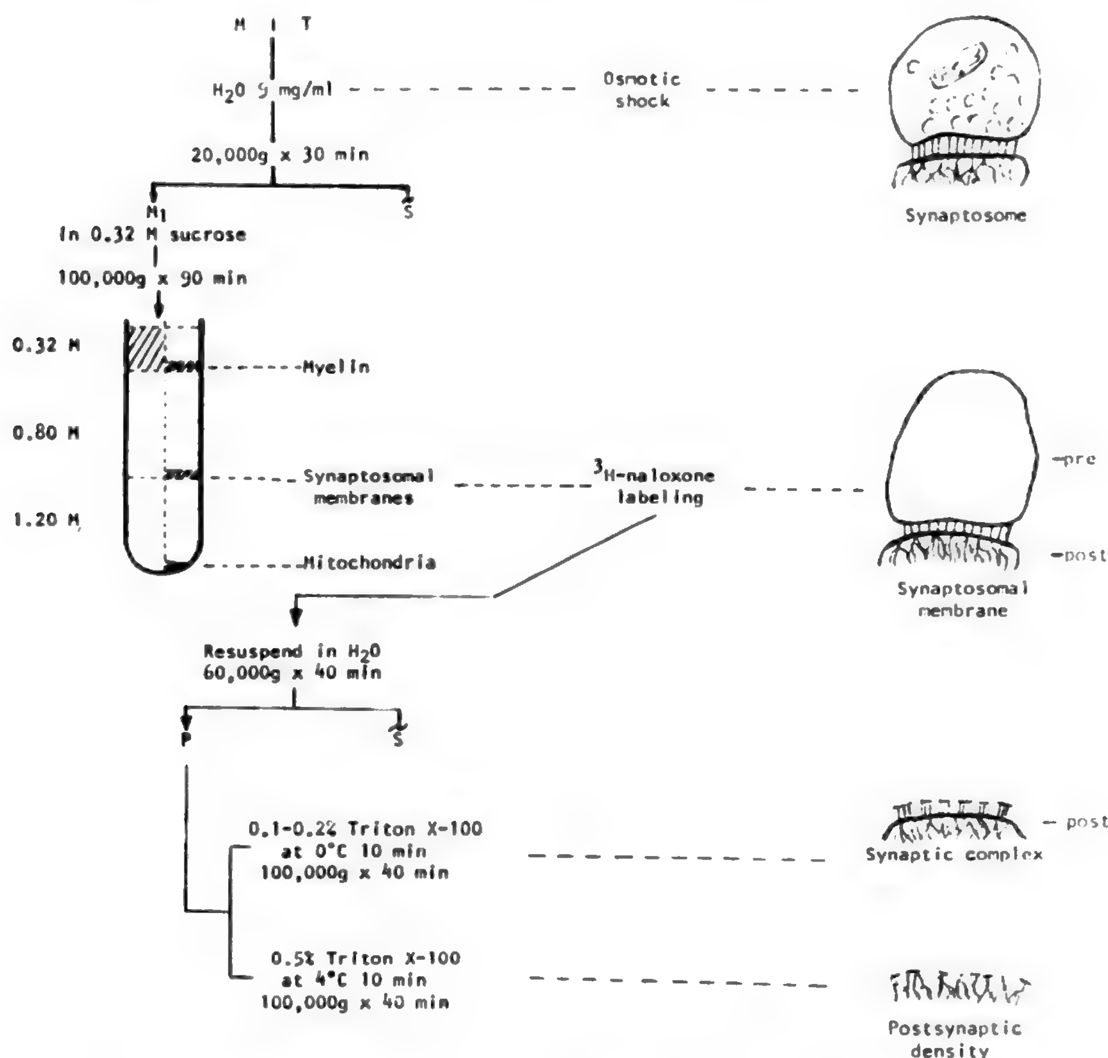


Fig. 2. — Diagrama que muestra la técnica de fraccionamiento celular usada para la separación de los receptores pre- y postsinápticos luego de la fijación de —H^3 a las membranas sinaptosomales. MIT fracción mitocondrial cruda; M, fracción cruda de membranas luego del choque osmótico del sinaptosoma. El complejo sináptico se compone principalmente de la membrana y la densidad postsináptica (de Criado y col., 1981).

La inyección intraventricular de 6-OH-dopamina produce la destrucción específica de las fibras catecolaminérgicas (noradrenalina y dopamina) que llegan a la corteza cerebral. Conjuntamente con este efecto, que lleva a la desaparición de los terminales catecolaminérgicos, se produce una considerable caída del contenido en noradrenalina y dopamina de la corteza. En un trabajo reciente observamos que la 6-OH-DA produce un marcado cambio en los receptores benzodiazepínicos. Se observó una disminución en el número total de receptores (B_{max}) y al mismo tiempo una notable disminución en K_D que representa un aumento en la afinidad [15].

Una región neuroanatómica muy interesante para estudiar la localización de los receptores es el hipocampo. Se trata de la región de la corteza más excitable del SNC y el sitio donde generalmente comienzan los fenómenos convulsivos característicos de la epilepsia. Por otra parte, el hipocampo parece tener mucha importancia en los fenómenos de aprendizaje y memoria. Desde el punto de vista estructural, el hipocampo se caracteriza por tener una disposición muy ordenada de sus células piramidales y granulosas y porque las diversas fibras, que llegan o salen del mismo, lo hacen por fascículos bien definidos. De éstos el más importante está representado por la fimbria-fornix. Por este último fascículo salen los axones de las células piramidales y llegan fibras colinérgicas del septum medio, fibras dopaminérgicas de la sustancia negra, fibras noradrenérgicas del *locus coeruleus* y serotoninérgicas de los núcleos del rafe.
bria-fornix en la rata encontramos, como

Estudiando el efecto del corte de la fim-
hecho interesante, que a los dos días hay una reducción muy significativa (– 40 %) de los receptores benzodiazepínicos, mientras que a los cinco días hay un aumento muy marcado (+ 65 %), que se mantiene por encima del control a los 14 días [3] (Tabla 2). Aunque por el momento es completamente desconocida la existencia de vías especiales benzodiazepínicas, es evidente que estos resultados sugieren que existe un cambio muy notable de estos receptores, probablemente por la sección de alguna vía que llega al hipocampo por intermedio de la fimbria-fornix.

En un estudio reciente hemos inyectado intraventricularmente ácido kaínico con el fin de destruir específicamente la capa piramidal de la región CA 3 del hipocampo (Figura 3). Como lo demostraron anteriormente [13], este agonista glutamatérgico produce la destrucción de las neuronas piramidales por un efecto de sobreestimulación. En estas ratas tratadas iv con ácido kaínico, donde la lesión está circunscripta a la región CA 3 *a-b*; sin embargo, una reducción muy notable en los receptores muscarínicos a los 30 días de la inyección (– 43 %). Este resultado demuestra que en esta región del hipocampo hay una gran concentración de receptores postsinápticos. Aún más interesantes

TABLA 2. — *Niveles de receptores a la benzodiazepina en el hipocampo de la rata luego de corte de la fimbria-fornix. Para la fijación se usó 8 nM flunitrazepam —H^3 utilizando el método de filtración. En el control no operado la fijación fue de 226.4 ± 10.9 fmol/mg, n indica el número de animales operados*

		Lado Ipsilateral (lesión)		Lado contralateral (sham)	
Día	n	B_{max} (fmol/mg prot.)	% Control	B_{max} (fmol/mg prot.)	% Control
1	7	205.5 ± 18.1	90.9	220.3 ± 8.6	97.3
2	8	139.5 ± 9.8	61.7*	219.5 ± 9.9	96.9
5	5	374.8 ± 34.2	165.5**	234.4 ± 19.2	105.3
14	6	258.7 ± 14.2	114.7***	216.6 ± 9.8	95.6

* $p < 0.001$ (en relación al control, test de Student).
** $p < 0.01$ con respecto al control; *** $p < 0.01$ (con respecto al lado contralacteral, test apareado) (Sábato y col. 1981a).

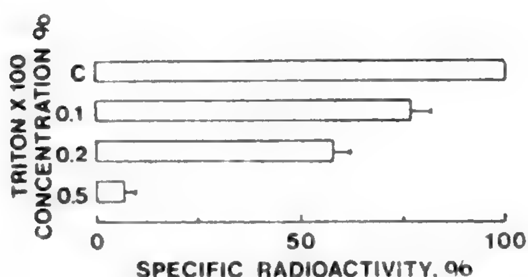


Fig. 3. — Resultado de la acción del Triton X-100 sobre la fijación de naloxona —H^3. Las membranas sinaptosomales fueron marcadas con 10 nM naloxona —H^3 y luego sometidas a concentraciones de detergente de 0.1, 0,2, y 0,5 % como se indica en la Figura 2. Se midió la radioactividad específica en el sedimento. Obsérvese que con 0.1 y 0.2 % Triton X-100 se eliminan los receptores presinápticos y con 0.5 también los postsinápticos (de Criado y col. 1981).

fueron los resultados obtenidos en ratas inyectadas con ácido kaínico, a las cuales se les hizo a los 14 días el corte unilateral de la fimbria-fornix. En este caso hubo una mayor reducción de los receptores muscarínicos (−57 %), lo que sugiere la posible existencia de una pequeña población de receptores presinápticos. Estos resultados son interesantes porque, hasta la fecha, sólo se habían podido demostrar receptores presinápticos por métodos fisiológicos indirectos [9, 12].

La importancia de los receptores presinápticos en diversos aspectos de la función del SNC será ilustrada con algunos ejemplos tomados de la literatura. Reader y col en animales en los cuales se colocaron cámaras de perfusión sobre la corteza cerebral para recoger los neurotransmisores liberados, encontraron que, cuando se hace un estímulo sensorial (p ej. lumínico o táctil) hay una mayor liberación de acetilcolina, la que se corresponde con una disminución de otros neurotransmisores, tales como noradrenalina o dopamina. Una posible explicación de este fenómeno es que la acetilcolina liberada actúa sobre receptores presinápticos catecolaminérgicos que reducen su secreción por un mecanismo de retroalimentación negativo. Este ejemplo sugiere que un neurotransmisor puede actuar modulando la secreción de otros neurotransmisores. Otro ejemplo se refiere a la vía primaria del dolor en la médula espinal. Se sabe que las fibras aferentes que vienen de la neurona primaria actúan liberando sustancia P y que la segunda neurona tiene receptores postsinápticos para este neurotransmisor. Sin embargo, existe una interneurona productora de encefalina (neurotransmisor opioide) que es capaz de actuar presinápticamente sobre la terminación aferente. De esta manera la secreción de encefalina podría modular la vía primaria del dolor. Este mecanismo podría estar involucrado en la acción anestésica de la acupuntura, ya que ésta produce una liberación de encefalina como puede demostrarse en el líquido cefalorraquídeo.

Kandel y col han demostrado que fenómenos de regulación presináptica pueden actuar en mecanismos básicos de aprendizaje en el SN de moluscos tales como la habituación y la sensibilización. Estos fenómenos se explican, respectivamente, por una reducción o por un aumento de la liberación del neurotransmisor, en ambos casos regulados por un mecanismo de acción presináptica.

Para referirme a la posible importancia médica de los receptores del sistema nervioso y con el deseo de estimular la discusión de los médicos presentes, sólo deseo mencionar algunas enfermedades y síndromes donde éstos aparecen modificados: 1) la miastemia grave, una enfermedad por autoinmunidad al receptor colinérgico; 2) la enfermedad de Parkinson, donde hay una degeneración del sistema nigro-estriatal y donde la L-dopa actúa activando receptores dopaminérgicos en el estriado; 3) la esquizofrenia, donde posiblemente existe una hiperactividad dopaminérgica que puede tratarse con bloqueantes apropiados (fenotiazinas, butirofenonas); 4) la disquinesia crónica tardía por acción prolongada de neurolépticos, que afectan a los receptores dopaminérgicos y también al sistema del GABA; 5) la corea, donde hay una degeneración primaria del estriado con alteración del GABA y del sistema colinérgico; 6) el hipertiroidismo, donde hay una hipersensibilidad a las catecolaminas que puede ser atenuada con bloqueantes de los receptores β-adrenérgicos; 7) la adición a los opiácios y otras drogas psicoactivas, cuyo mecanismo de acción es complejo y aún poco conocido.

En resumen, la multiplicidad de re-

ceptores centrales y su localización pre- y postsináptica sugieren la existencia de un grado de complejidad mucho mayor que el obtenido por el mero estudio de los numerosos neurotransmisores. Los receptores presinápticos pueden modular la respuesta sináptica regulando la secreción del neurotransmisor y tal vez intervenir en fenómenos más complejos, que están en la base de los mecanismos sinápticos del aprendizaje y la memoria. El estudio de los receptores centrales es de fundamental importancia en diversas enfermedades neurológicas y mentales.

Agradecimientos: Las investigaciones originales incluidas en esta Conferencia recibieron ayuda del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) y SUBCYT (Subsecretaría de Ciencia y Técnica).

Bibliografía

1. Aguilar JS, Criado M, De Robertis E: Pre- and postsynaptic localization of central muscarinic receptors. *Eur J Pharmacol* 57: 227, 1979.
2. Aguilar JS, Criado M, De Robertis E: Action of detergents on ^{3}H-dihydro-ergokriptine binding and localization of α-adrenoreceptors in synaptosomal membranes. *Eur J Pharmacol* 61: 47, 1980.
3. Aguilar JS, Salas P, De Robertis E: Muscarinic receptor in synaptosomal membranes. Heterogeneity of binding sites for L-quinuclidinyl ^{3}H-benzilate. *Mol Pharmacol* (en prensa).
4. Cohen RS, Blomerg F, Berzins K, Siekevits P: The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. *J Cell Biol* 74: 181, 1977.
5. Criado M, Aguilar JS, De Robertis E: Action of detergents and pre-and postsynaptic localization of ^{3}H-naloxone binding in synaptosomal membranes. *J Neurobiol* 12: 259, 1981.
6. De Robertis E: Synaptic Receptors. Isolation and Molecular Biology. Dekker, New York 1975.
7. De Robertis E, Azcurra JM, Fiszer S: Ultrastructure and binding capacity of junctional complexes isolated from rat brain. *Brain Res* 5: 45, 1967.
8. De Robertis E, Rodríguez de Lores Arnaiz C, Pellegrino de Iraldi A: Isolation of synaptic vesicles from nerve endings of the rat brain. *Nature* 194: 794, 1962.
9. Hadhásy P, Szerb JC: The effect of cholinergic drugs on ^{3}H-acetylcholine release from slices of rat hipocampus, striatum and cortex. *Brain Res* 123: 311, 1977.
10. Katz B, Mileli R: The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. *J Physiol* 224: 665, 1972.
11. Langer SZ: Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. *Brit J Pharmacol* 60: 481 1977.
12. Marchi M, Paudice P, Raiteri M: Autoregulation of ACh release in isolated hippocampal nerve endings. *Eur J Pharmacol* 73: 17, 1981.
13. Nadler JV, Perry BW, Cotman CW: Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 271. 676, 1978.
14. Sábato UC, Aguilar JS, Medina JH, De Robertis E: Changes in rat hippocampal benzodiazepine receptors and lack of changes in muscarinic receptors after fimbria-formix lesions. *Neurosci Letter* (en prensa).
15. Sábato UC, Novas ML, Lowenstein P, Zieher LM, De Robertis E: Action of 6-hydroxydopamine on benzodiazepine receptors in rat cerebral cortex. *Europ J Pharmacol* 73: 381, 1981, *b*.
16. Szerb JC, Somogyi GT: Depression of acetylcholine release from cerebral cortical slices by cholinesterase inhibitors and by oxotremorine. *Nature New Biol* 241: 121, 1973.

— — — —

No basta dar pasos que un día puedan conducir hasta la meta, sino que cada paso ha de ser una meta, sin dejar de ser un paso.

JUAN PEDRO ECKERMAN

Conversaciones con Goethe

MEDICINA

FUNDADA EN 1939

PUBLICACION BIMESTRAL

(Registro de Propiedad Intelectual Nº 1.051.984)

MEDICINA no tiene propósitos comerciales. El objeto de su creación ha sido propender al adelanto de la medicina argentina. Los beneficios que pudieran obtenerse serán aplicados exclusivamente a este fin

Publicada con el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

EDITORIALES

El cerebro escindido

Premio Nobel de Medicina 1981: Roger Sperry

En el año 1967 se publicó en *Medicina (Bs Aires)* un editorial denominado *La unidad de la consciencia*, en el cual se mencionaban los experimentos de Sperry y sus colaboradores. Ellos no fueron los primeros en realizar la sección del cuerpo calloso, la comisura anterior y la masa intermedia, pues ya en el año 1940 von Wagenem y Herren y otros realizaron esta separación de ambos hemisferios en enfermos epilépticos intratables. En general, los resultados fueron favorables desde el punto de vista terapéutico y, lo que resulta más sorprendente, es que, al igual que se demostró en animales de experimentación, no se produjeron alteraciones sensitivas y motoras de importancia como tampoco trastornos psíquicos. Esto concuerda con la normalidad que presentan los enfermos con degeneración primaria del cuerpo calloso, denominada enfermedad de Marchiafava. Sperry, un investigador de las funciones superiores del sistema nervioso central, ha proseguido con espíritu de investigador y no exclusivamente terapéutico el resultado de la separación de ambos hemisferios. Sperry tenía experiencia en este tipo de acercamiento a problemas neuropsicológicos, pues desde el año 1952 había estudiado las relaciones de la mente y el cerebro, profundizando el problema fundamental que significa aceptar las teorías materialistas que hacen de los fenómenos mentales un epifenómeno, un paralelismo o una identidad respecto a los procesos cerebrales. El punto crucial de las teorías materialistas, según Popper (1977), reside en que los fenómenos mentales no pueden actuar, influir o modificar la maquinaria neuronal. Con la terminología de Popper, el Mundo uno, o sea el mundo material, está cerrado a los fenómenos mentales o sea el llamado Mundo dos. Sperry, por su parte desde el año 1965 ha desarrollado en varias publicaciones una teoría materialista pero que admite un papel causal de los fenómenos mentales en los acontecimientos cerebrales. Sperry sugiere que hay propiedades holísticas de la consciencia en los procesos cerebrales. "Estas propiedades mentales especiales no han sido descriptas objetivamente en forma alguna. Hay propiedades holísticas aun por descubrirse. Predecimos que, una vez que se descubran y se entiendan serán interpretadas como algo diferente y algo más que los eventos neurales que las componen". Sperry denomina esta teoría, que según él no es dualista, "interaccionismo emergente". Para Eccles, la teoría denominada "materialismo emergentista" por Bunge, y que es posterior a la teoría de Sperry no se diferencia casi de la misma. Según Eccles, la teoría de Sperry tomada en profundidad es un dualismo con una apariencia materialista.

No es de extrañar que con este *background*, Sperry haya podido estudiar fructíferamente a un grupo de alrededor de 20 enfermos, que habían sido sometidos a una comisurotomía por padecer de epilepsia refractaria al tratamiento médico y que como dijimos al comienzo de este editorial, no manifestaban después de la operación alteraciones físicas o psíquicas ostensibles. Podían caminar, nadar, bucear, dormir bien, etc., y en su vida emocional no habían experimentado variaciones significativas. Seguían siendo la "misma" persona para sus familiares. Esta aparente indemnidad fue lo que determinó la creencia que la comisurotomía, con la sección de los 200 millones de fibras del cuerpo calloso, y las otras comisuras menores, no modifica al sujeto operado. Sólo cuando Sperry y colaboradores investigaron minuciosamente con ingeniosos procedimientos que permiten interrogar a uno u otro hemisferio cerebral, aparecen las curiosas alteraciones que produce la separación. Se sobreentiende que la comisurotomía no se extiende a las fibras que vinculan a ambos hemisferios a niveles inferiores.

Sperry sus colaboradores, Bogen, Gazzaniga, Levy, Levy Agresti y otros, tuvieron que vencer la dificultad que presentan los campos visuales ya que en cada ojo las fibras del nervio óptico van a ambos hemisferios. Por tanto, el reconocimiento de objetos y órdenes escritas debían sortear esta dificultad con dispositivos especiales o con lentes que permiten proyectar las imágenes sólo al campo visual que se quiere explorar.

Los resultados fueron sorprendentes y trascendentales. La experiencia consciente se halla exclusivamente en el hemisferio izquierdo. Los sujetos tienen consciencia de que son los mismos que antes de la operación (la unidad mental que el neurólogo belga Bremer señalaba en 1966). Hablan, hacen cálculos, la memoria es correcta y recuerdan sin dificultad acontecimientos anteriores. Sin embargo, todo lo que sucede en el hemisferio derecho no entra a la consciencia del individuo que mira con asombro cómo su mano derecha —la denominada "mano traviesa"— ejecuta órdenes que él no tiene la menor idea de que le son dadas. El hemisferio derecho, hemisferio mudo, lo es realmente para la expresión, sin embargo entiende órdenes escritas o dibujos si no son demasiado complicados. Aparte, cumple algunas funciones más hábilmente que el hemisferio dominante: reconocimiento táctil más rápido de sólidos y de figuras, recomposición de formas con cubos de colores, copiar dibujos de cubos de Necker, cruces de Malta, etc. A su vez, el hemisferio izquierdo ejecuta más torpemente este tipo de reconocimientos porque le falta la información que sin la comisurotomía le envía el hemisferio menor. Las preguntas que surgen son: ¿Este hemisferio derecho tiene consciencia de sí mismo, es capaz de planificar, es otra mente actuando en el mismo individuo? En dos pacientes que Sperry pudo estudiar minuciosamente el hemisferio menor demostró respuestas conscientes —no *self conscious*— superiores a los que exhiben los primates no humanos. Es decir, que tiene consciencia que le permite resolver los problemas pero eso no significa ser autoconsciente. Sin embargo, en los experimentos con recomposición de fotografías, además de demostrar la superioridad del hemisferio menor en la rapidez del reconocimiento, pudo comprobarse que cuando se le mostró al sujeto de la experiencia su propia fotografía, que el individuo sonrió, y cuando se le preguntó quién era se señaló a sí mismo. Este reconocimiento, sin embargo, no ingresaba a la consciencia (hemisferio izquierdo), o sea a la autoconsciencia. La introspección no le permitió reconocer lo que estaba ocurriendo.

Es interesante señalar que las conexiones que existen entre ambos hemisferios a niveles inferiores de la corteza, el sistema límbico y sus conexiones con el hipotálamo y el sistema autónomo, permiten que se produzcan reacciones automáticas sin que el individuo sepa el por qué cuando es el hemis-

ferio derecho el estimulado. Así, a una joven se le mostró en su campo visual izquierdo la fotografía de un desnudo. La joven no experimentó ninguna emoción consciente y tampoco se daba cuenta que estaba viendo algo, sin embargo se ruborizó.

Eccles dice textualmente: "Es nuestra opinión que las extraordinarias implicaciones que surgen de estas investigaciones referentes al problema de la autoconsciencia no han sido suficientemente apreciadas por filósofos y científicos. Esto ocurre porque aun no hay un clima preparado para una evaluación crítica de estos resultados sorprendentes y revolucionarios".

No sabemos si las investigaciones de Sperry y colaboradores que han merecido el premio Nobel de Medicina, compartido con Hubel y Wiesel, en el año 1981, abrirán nuevas vías a corto plazo en el estudio de las funciones superiores del sistema nervioso central. Estas día a día aumentan su complejidad y requieren enfoques multidisciplinarios. Pero es seguro que mucha gente, científicos, filósofos, psicólogos y también la gente común que se hace preguntas fundamentales, se asomarán con interés a las conclusiones de esta investigación genial.

ALFREDO LANARI

La cartografía del cerebro
Premio Nobel de Medicina 1981: David Hubel y Torsten Wiesel

¿Será posible que el cerebro humano llegue alguna vez a comprender su propio funcionamiento? Recientemente el Dr. David Hubel, uno de los galardonados con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología de 1981, afirmó que "hoy pensamos en forma diferente acerca de la mente: no la concebimos como un objeto místico sino que consideramos que puede ser comprendida". Independientemente del juicio que suscite tal convencimiento, del análisis de la labor desarrollada por los tres científicos premiados este año, los Dres. Roger Sperry, Torsten Wiesel y el ya citado Hubel, se desprende que al menos los investigadores han comenzado a dar los primeros pasos en la senda que conduce al logro del objetivo más ambicioso que se ha propuesto nuestra civilización: entender el funcionamiento del cerebro humano.

En un artículo reciente, Hubel y Wiesel han afirmado: "Especular globalmente acerca de la forma en que el cerebro opera no es afortunadamente el único camino que se ofrece a los investigadores. Explorarlo en funcionamiento resulta muy entretenido y parece ser mucho más provechoso". Consecuentes con esa concepción, Hubel y Wiesel han explorado el cerebro milímetro a milímetro desde fines de la década de 1950. Sus trabajos, de similar trascendencia que las investigaciones de Sperry comentadas en el Editorial anterior y realizados en el Instituto de Neurobiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Harvard, han buscado aclarar el proceso mediante el cual los rayos luminosos que impresionan la retina configuran la imagen del mundo exterior que somos capaces de percibir. Mediante experiencias realizadas en animales en los que colocaron microelectrodos en distintas células a lo largo de la vía visual, pudieron "escuchar" la conversación de las células nerviosas en respuesta a estímulos presentados en el campo visual del animal. Durante más de dos décadas, Hubel y Wiesel se dedicaron a esta tarea que requiere precisión, delicadeza y mucha suerte. Registraron la respuesta de miles de células y ello les permitió poner de manifiesto la existencia de una sofisticada

maquinaria procesadora de información que posee una estructura elegante, ordenada y con nítidas diferencias jerárquicas.

Si bien analizaron el tráfico de impulsos a lo largo de toda la vía nerviosa visual, desde las células ganglionares de la retina a la corteza comprendidas las estaciones intermedias de relevo, sus principales trabajos estuvieron destinados a examinar el procesamiento de la información visual a nivel de la corteza occipital. Describieron allí la presencia de diversos tipos de células dispuestas de acuerdo con la forma en que operan. La mayoría de ellas responden sólo a líneas de una orientación particular, cubriendo todas las orientaciones posibles, desde la vertical a la horizontal y viceversa. Estas llamadas células "simples" son muy exigentes en lo que respecta a la orientación de las líneas ya que se silencian si las mismas se desplazan en 10 ó 20 grados de la inclinación que prefieren. Hay además diversos tipos de células que, aunque en forma menos estricta, responden también a una orientación preferida. No se sabe aún con certeza cómo esas células que se excitan por líneas o ángulos particulares contribuyen a la formación de nuestra imagen del mundo, pero posiblemente lo hagan definiendo bordes y contrastes. Esto señala que la corteza cerebral realiza una función discriminativa importante al descomponer la información visual y luego integrarla, en forma aún desconocida, para formar la imagen visual.

Los estudios de Hubel y Wiesel permitieron demostrar además que estas células no están distribuidas al azar en el tejido cortical. Se hallan dispuestas en columnas y capas con una organización determinada en forma muy precisa. Si el electrodo explorador penetra en forma perpendicular a la superficie de la corteza, todas las células que encuentra en su trayecto responden a la misma orientación. Si por el contrario se explora en una dirección paralela a la superficie, la orientación preferida cambia en unos pocos grados cada 25 ó 50 micrones.

En base a estos hallazgos, más tarde confirmados por técnicas que permiten estudiar la actividad de las células nerviosas mediante el empleo de precursores metabólicos radioactivos, concluyeron que todo el campo visual está representado en la corteza por columnas de células que responden a estímulos similares, pero que los procesan en niveles crecientes de complejidad. Se determinó, además, que columnas adyacentes corresponden a porciones vecinas del campo visual.

Superpuesto a este sistema, existe otro conjunto de columnas que permite comenzar a comprender la forma en que el cerebro coordina la información proveniente de ambos ojos. Algunas células responden más vigorosamente a estímulos provenientes del ojo derecho mientras que otras lo hacen con la información que proviene del izquierdo. Esta dominancia ocular, que así se denomina, está también distribuida en bandas, cada una de las cuales tiene alrededor de medio milímetro de espesor. Esta organización columnar de la corteza cerebral, sostenida fundamentalmente por Vernon Mountcastle, ha recibido apoyo experimental no sólo en el caso comentado de la corteza visual, sino también en estudios realizados en otras áreas corticales.

De especial significación para la medicina han sido las investigaciones realizadas por Hubel y Wiesel con el objeto de demostrar la forma en que se produce la interconexión de las células nerviosas en la vía visual durante el desarrollo del animal. Si bien las conexiones están presentes desde el momento del nacimiento, no son muy precisas durante las primeras semanas de vida. Así, si un gato o un mono recién nacidos no experimentan una estimulación visual adecuada durante las primeras semanas de vida, el "período crítico",

crecen con serias alteraciones en su visión. Estos estudios han brindado apoyo científico a la necesidad de corregir los defectos en la visión de los niños pequeños lo antes posible a fin de favorecer el normal establecimiento de las conexiones en su vía visual. Asimismo, en base a estos hallazgos, se trata de brindar a los recién nacidos un entorno visual lo más variado posible para estimular el funcionamiento de estos circuitos en el período de su consolidación.

Los mapas globales de localización de las funciones cerebrales que han permitido construir las experiencias de Sperry, así como el análisis detallado del procesamiento de la información visual en zonas específicas de la corteza debido a las investigaciones de Hubel y Wiesel, han contribuido en forma decisiva a avanzar en el logro del objetivo antes mencionado: la comprensión del funcionamiento cerebral, así como a fortalecer la creencia que, después de todo, el cerebro tal vez sea comprensible.

GUILLERMO JAIM ETCHEVERRY

El diagnóstico radiológico de los microadenomas hipofisarios prolactínicos

La radiología fue desde un principio utilizada en el diagnóstico de los tumores hipofisarios. Se trataba entonces de tumores relativamente grandes como los adenomas cromófobos o eosinófilos, que ocupaban la silla, y en su crecimiento deformaban y aumentaban la silueta de la silla turca.

¿Cuál es el mecanismo de la alteración del hueso por un tumor benigno vecino? El hueso no es invadido como es el caso del tumor maligno sino que actúa por el contacto y presión del tumor. Para que exista esta presión, tiene que existir *algo* que apuntale al tumor e impida el desplazamiento, o sea que mantenga la presión sobre el hueso. En el caso de los tumores relativamente grandes de la hipófisis, la silla se llenaba totalmente, y la presión del tumor en crecimiento producía un aumento general de la silla turca.

En el caso de los tumores cuyo tamaño es francamente menor que la silla, es lógico esperar que el crecimiento tumoral se haga hacia el interior de la silla y no comprometa precozmente al hueso. Tal sería la situación de los microadenomas. Sin embargo, el diagnóstico radiológico de los microadenomas es considerado como un procedimiento confiable y sumamente sensible, y su eficacia alcanza a más del 90 % de diagnósticos positivos (Ferrari en nuestro país afirma que se acerca al 100 %).

Otro aspecto del problema es el énfasis que se pone en el uso de la tomografía y dentro de los tomógrafos al llamado Politomo (aparato francés que probablemente es el mejor tomógrafo que ha existido). Creo que si éste es un problema que se resuelve en semejante porcentaje, no parece probable que los otros tomógrafos sean tan inferiores.

Estamos, pues, ante un problema algo curioso. No hay duda que los microadenomas existen y que su diagnóstico basado en criterios clínicos y de laboratorio nadie discute y que la cirugía resuelve exitosamente. La radiología, en cambio, proporciona datos no siempre concordantes. Por eso adquiere especial valor el trabajo de Carin Muhr, R. Bergström, L. Grimelius y S. Larson (*Neuroradiology* 21: 55, 1981), que enfoca el problema desde otro ángulo. Este trabajo se basa en 205 autopsias de enfermos de edades diversas, cuya causa de muerte nada tiene que ver con la hipófisis o la región hipotalámica. La edad oscilaba entre 15 y 93 años, con una edad media de 70. La mayor

causa de muerte era cardiovascular y en menor grado cáncer. Como dato curioso se encontraron cuatro tumores cerebrales benignos asintomáticos sin relación con la causa de la muerte. Previo estudio radiológico del cráneo y especialmente la región selar (radiografías y tomografías) se procedió al análisis de las imágenes obtenidas.

Los resultados del estudio de este material que no tenía ningún hallazgo patológico en la silla fueron, sin embargo, sorprendentes por la gran cantidad de anomalías que se observaron en las piezas examinadas: de las 205 autopsias se encontraron 39 casos de asimetría del piso de la silla y en 23 casos se observaron irregularidades del piso con adelgazamiento óseo, erosiones e irregularidades localizadas. El estudio anatomopatológico de las regiones donde se encontraron estas anomalías, no demostró patología alguna.

Como síntesis de este importante trabajo se establece que no se encontró correlación alguna entre las alteraciones observadas con hallazgos patológicos. Se llega a la conclusión que estos hallazgos descriptos por otros autores como característicos de un microadenoma de hipófisis pueden ser considerados como variantes sin significado patológico y no tener valor para diagnosticar un microadenoma hipofisario. Es evidente que este trabajo que cuestiona puntos de vista compartidos por muchos autores, será discutido y probablemente no se agotará el tema. Su aporte es muy importante, por su enfoque novedoso y como crítica a los que llegaron a afirmaciones tajantes sin una base convincente.

CARLOS F. LANARI

Houssay y el serendipismo

El camellero preguntó a los tres príncipes si por casualidad habían visto a su camello, y los tres sucesivamente le preguntaron, a su vez, si el camello perdido era tuerto, si le faltaba un diente, si era rengo, si llevaba a un costado una alforja con manteca y del otro una con miel, si no transportaba sobre su joroba una mujer, y si ésta no estaba embarazada. A todo tuvo que contestar el camellero que sí y salió a buscar al camello perdido. Como no lo encontró acusó a los príncipes de habérselo robado, y los tres fueron encarcelados. Enterado el emperador Beramo, harto de los salteadores de caminos, montó en cólera y condenó a los hermanos a una muerte vergonzante. Ante la acusación explicaron que eran tres viajeros que recorrían el mundo para observar sus maravillas, que nunca habían visto al camello y sólo quisieron gastar una broma al camellero basándose en algunas observaciones realizadas en su viaje. El animal apareció, el emperador pidió disculpas a los príncipes y los liberó, pero les rogó que explicasen cómo se habían informado de los detalles que dieron al camellero sin haber visto nunca al camello. Contestaron que como era tuerto había comido el pasto del lado del camino en que era malo, y no el del otro, donde era bueno; por faltarle un diente se le habían escapado de la boca pelotones de rumia visibles en la senda; había huellas de tres pezuñas y de una pata arrastrada; las hormigas que vieron en un largo trecho indicaban que allí había caído manteca, y otro tanto ocurría con las moscas atraídas por la miel; habían deducido que llevaba a una mujer porque cerca del sitio donde el camello se había arrodillado vieron la huella de un pie pequeño y restos de orina que exhalaba concupiscencia (por lo tanto el pie no era de un niño), y que estaba embarazada porque para incorporarse después de orinar había apoyado sus manos en el polvo dejando las huellas...

Y a continuación sigue la historia del "Peregrinaggio" de los Príncipes de

Serendip, traducida del persa al italiano por Christoforo Armeno en 1557 (*Serendipity and the three Princes - From the Peregrinaggio*, editado por T. C. Remer; Univ. of Oklahoma Press, Norman, 1935). Serendip es el antiguo nombre de Ceylán y es de donde viene el concepto de *serendipity* en inglés (Serendip + *ity*), difundido por Horatio Walpole (1717-1797) en una carta a un amigo en la que le anunciaba el feliz arribo de un cuadro de la Gran Duquesa Bianca Capello y de sus sagaces observaciones realizadas casualmente. En español no tiene equivalente hasta ahora, pero merece tenerlo: *serendipismo* (serendip + *ismo*). Proponer una nueva palabra no ofrece riesgos: si es aceptada, tarde o temprano irá a parar al diccionario, si no, pronto será olvidada sin daño para nadie.

Serendipismo es la facultad o don de hacer descubrimientos *por accidente y sagacidad* de cosas que no se están buscando. No es descubrir por casualidad, sino que, además, lo hallado debe ser interpretado con sagacidad. Por lo tanto no es equivalente del dicho de Pasteur: "Dans les champs de l'observation, le hasard ne favorise que les esprits préparés", pues la observación integra un proceso deliberado, y no casual, y si bien un espíritu preparado puede dar un buen uso a lo descubierto, uno no preparado también puede dárselo. La casualidad y la sagacidad son tan inherentes al concepto como el propio hallazgo.

De los dos procedimientos de investigación de los fenómenos naturales, la *observación* se beneficia con el serendipismo, aún considerado en su acepción simple de lo descubierto por casualidad, y Walter Cannon cita en "La ruta de un investigador" numerosos ejemplos. En realidad por esta vía se han hecho descubrimientos no sólo en las ciencias biológicas, sino también en las físicas y en cualquiera otra, inclusive el descubrimiento de América. Cuando se investigan los fenómenos de la naturaleza provocándolos o modificándolos por la *experimentación*, la situación es diferente y aunque en el campo experimental el serendipismo también algo hace, ningún investigador podría programar sus investigaciones esperándolo, aparte de que la cuota de que cada uno goza puede variar entre cero y un alto nivel —en el caso de gran suerte.

Y ahora llega el momento de preguntarse qué influencia tuvo el serendipismo en la obra del profesor Bernardo A. Houssay. La respuesta es por la negativa. El mismo lo dice: "Es un rasgo distintivo verdadero la dedicación constante a la investigación". Nada de accidental, aunque quedaba lugar para la sagacidad. Los príncipes encontraban cosas que no buscaban y Houssay sí que las buscaba. Decía: "Se sabe que la vocación es firme y verdadera cuando el candidato se esfuerza en concluir lo más pronto posible y correctamente sus trabajos...". En consecuencia ni esperarlo ni confiar en el azar. Agregaba: "El desinterés del investigador auténtico suele ser profundo, pues lo único que busca es trabajar bien... lo inspira una devoción profunda por la ciencia, pasión dominante a la que suele consagrarse con fidelidad definitiva y sin detenerse ante las mayores dificultades..." "espíritu de investigación, o sea iniciativa y no pasividad...". Sin embargo, algo apunta al don de los príncipes de Serendip, pues el investigador "Poseerá una inteligencia clara, perfeccionada por el ejercicio, para comprender bien y seguir a fondo los razonamientos. Debe adquirir capacidad de síntesis y aptitud para seguir las deducciones hasta sus últimos extremos..." que podría ser llegar a la conclusión de que un camello perdido, al que no habían visto nunca, era tuerto, sin un diente y rengo, cargaba una alforja de miel, otra de manteca y una mujer embarazada, tras lo cual lo único que lograron fue ir presos y casi condenados a muerte. Pero los príncipes iniciaron su "Peregrinaggio" porque el rey Giaffer, su padre, los expulsó del reino y no porque pretendieran descubrir los secretos de la naturaleza. En realidad, hol-

gaban. Houssay dice que "Para tener éxito en la investigación hay que tener perseverancia, tenacidad y energía.... Concentración mental a un estudio, sin dejar distraerse...". Ellos se distraían resolviendo acertijos que les ofrecía la Reina de la India. "En ciencia no se puede improvisar, es necesaria una preparación previa, que es larga y exige esfuerzo y preparación adecuada".

A propósito de las investigaciones de Houssay, el Dr. Virgilio Foglia nos cuenta cómo, con un sano planteo inicial, mediante la organización de un plan riguroso, desenvuelto progresivamente a través de múltiples experimentos en batracios y mamíferos, llegó al "descubrimiento del papel desempeñado por el lóbulo anterior de la hipófisis en el metabolismo de los hidratos de carbono", como dice la citación del Premio Nobel. En todo este largo proceso, el azar no se asomó, aunque sí lo hizo la sagacidad, y todo fue cumpliéndose en forma consecutiva, con un experimento que llevaba a otro, al modo de Claudio Bernard, hasta llegar, después de una racional perseverancia, a la coronación final. Tuvo que agregar, además, la compleja manipulación experimental.

Yo atestigüé cómo se desarrollaba un proceso de investigación, a lo largo de muchos años, desde la inspiración hasta la solución. Houssay publicó su primer trabajo sobre la diabetes insípida en el perro en 1915, que extendió en 1920 a 1922, para completarla con investigaciones en el sapo en 1925. En 1931 ingresé al Instituto de Fisiología como ayudante de trabajos prácticos, y el 15 de diciembre de 1933 rendí mi última materia. De inmediato, Houssay me dijo que, como ya le había pedido podría empezar a trabajar en mi tesis y para elegir el tema me citó a su casa de la calle Viamonte para el lunes 1º de enero de 1934. Ya en su escritorio, en el que reinaba una ficticia confusión, extrajo de un fichero varias tarjetas donde había escrito los temas que pensaba desarrollar en el futuro. Dejó que las examinara y me invitó para que las llevara, pero hice la elección de inmediato, que aprobó. Volvió a levantarse y de un cajón de la biblioteca sacó un gran sobre blanco que llevaba escrito de su letra, con lápiz, "poliuria en el sapo", y que contenía los protocolos (que aquí están bajo mi vista) de los trabajos realizados 9 años atrás. Con tinta llevan anotadas las diuresis de cada sapo. "Esto nunca me satisfizo" dijo, "las diuresis son muy desiguales". A los pocos días empecé mi trabajo, que se basaba en animales hipofisectomizados y con lesiones en el túber, pero las operaciones Houssay las hacía personalmente, trabajo que realizaba con gusto y también con la seguridad de que se hacía bien, y que sólo varios meses después me dejó practicar. Después de operados los sapos eran devueltos a su pileta y diariamente yo medía las diuresis, que seguían muy desiguales, pero pronto, en una de nuestras vueltas me dijo: "Vea lo que pasa, los sapos se apilan unos sobre otros y se mueven poco, los de arriba tienen poca agua disponible para absorber; los de abajo disponen de mucha agua. Hay que solucionar esto". La solución fue simple: se compraron jarros de hierro enlozado y cada animal residía en el suyo con una cantidad fija de agua. Las diuresis se tornaron parejas para cada grupo de operados y testigos. Después de varios años y de utilizar más de 1000 sapos de los 18 000 que se calculaba habían sido utilizados en el Instituto hasta ese momento, se llegó a la conclusión, entre otras, que la poliuria se debía a la supresión del lóbulo nervioso de la hipófisis, que no era necesaria la presencia del lóbulo anterior y que la hormona antidiurética no actuaba sobre la absorción cutánea sino exclusivamente sobre el riñón y en éste sin afectar la irrigación glomerular.

En 1928 Houssay publicó un extenso trabajo sobre "La vida de la cabeza aislada". No volvió a trabajar sobre este tema, hasta que más de 10 años después me llamó a su escritorio y me dijo que su intención era retomarlo, que se trataba de experimentos laboriosos, de compleja técnica y que deman-

daban largo tiempo, que como la observación de cada operación se prolongaba muchas horas y que como había visto que yo iba todos los días y me quedaba todas las tardes sin aparente apuro, me proponía ayudarle. Fue así como se inició una serie de experimentos cuyo eje era la conexión del tronco de un perro a dos cabezas, una de cada lado, una de ellas hipofisopriva, de tal modo que el animal podía ser irrigado alternativamente por cada una, en tanto se registraba la diuresis, la presión arterial y otras variables, con proyecto de estudiar ulteriormente diversos procesos fisiológicos influidos por vía nerviosa o por vía hormonal. (¡Qué programa para aplicar al estudio de los péptidos cerebrales!). Hasta 1943 se repitieron muchos de estos más que laboriosos experimentos, que lamentablemente no llegaron a completarse por fuerzas ajenas a su voluntad.

Tanto los trabajos sobre diuresis en el sapo como los de cabeza aislada, desde el momento en que le interesaron por primera vez hasta que finalizó su realización, se cumplieron a lo largo de muchos años, mediante una experimentación simple o compleja, pero trazada de antemano con criterio riguroso, sin desviaciones especulativas, no obstante la inteligencia, la lucidez y la sagacidad que los alentaba, pero invariablemente sin la intervención de accidentes afortunados. Y es que las virtudes científicas de Houssay eran tan estrictas en su aposición –como las piedras de Machupicchо– que no dejaban resquicios para el serendipismo.

R. Q. Pasqualini

– – – –

Le hasard c'est peut-être le pseudonyme de Dieu, quand il ne veut pas signer.

Suerte es quizás el seudónimo de Dios cuando El no quiere firmar.

Anatole France (1844-1924)

El todo y sus partes en Investigación Científica

La comunidad científica recibió conmocionada las declaraciones del actual Ministro de Salud Pública de la Nación, Brigadier Amílcar Argüelles. Que el Sistema de Ciencia y Técnica argentino era ineficiente no constituyó motivo de sorpresa para ellos: es muy difícil poseer un sistema eficiente donde los supersistemas y los subsistemas no lo son. Lo que realmente abrumaba eran las cifras: más de 1200 millones de dólares gastados en un año sin réditos proporcionales al gasto, mientras países como Holanda y Suecia destinaban mucho menores recursos económicos a este *métier*.

Recordábamos que alguien había dicho: "Somos un país tan pobre que no nos podemos dar el lujo de no invertir en investigación"; recordábamos también la frase: "Los países desarrollados lo son por destinar fondos a la investigación, y no dedican fondos a la investigación por ser desarrollados"; recordábamos esto y mucho más. Recordábamos, por ejemplo, haber escuchado a nuestros premios Nobel en Ciencias (cada uno en su oportunidad) reclamar más fondos para Ciencia y Técnica. ¿Dónde estaba la contradicción? Los periódicos de nuestro país escribían sueltos y editoriales al respecto, en Universidades y Organismos de Investigación se hablaba sobre el tema.

Abrir juicios sobre el "todo" era muy difícil para mí, entonces comencé por las "partes". Dirijo un Centro de Investigaciones Cardiovasculares cuyo presupuesto es de alrededor de 150 000 dólares anuales, es decir aproximadamente la diezmilésima parte de la cifra proporcionada por el Ministro. Era evidente que para que la cifra que el Ministro propusiera fuera representativa de algo homogéneo, nuestro Centro debía de ser en producción, importancia científica, promoción de recursos humanos y todos aquellos subproductos tan difíciles de mensurar en Investigación, una diezmilésima parte del "todo". El mismo Ministro había expresado que en nuestro país funcionan aproximadamente 160 Centros, Institutos o Programas. De ser una parte en 160, a una parte en 10 000 hay una diferencia enorme... Pensé que los análisis de las partes individuales no conducen a nada: era necesario analizar una parte mayor, una parte representativa del universo. Busqué los datos de las erogaciones en Investigación Científica en el ámbito de la Universidad Nacional de La Plata. Sumé los fondos provenientes del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas para los aproximadamente 15 Centros o Institutos que funcionan en esta área, más lo proporcionado por la Subsecretaría de Ciencia y Técnica, más lo otorgado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, y obtuve una cifra aproximada a los 8000 millones de pesos ley, lo que convertí (con un dólar de $ 8000) en la cifra de 1 millón de dólares. Pero como aquí no figuraban sueldos, ni subsidios aislados a investigadores autónomos no pertenecientes a Centros o Institutos del CONICET, podríamos duplicar esta cifra (!), y tendremos entonces 2 millones de dólares en 1981 en el ámbito de la Universidad Nacional de La Plata. Aproximadamente, una milésima parte de la cifra que dijera el Ministro. No pensaba yo que la contribución de nuestra Universidad a Ciencia y Técnica fuese de sólo una milésima parte de la Investigación Científica de nuestro país. Sí podría aceptar (y con reservas) que fuese una parte en veinte, pero de una parte en veinte a una parte en mil hay una diferencia enorme...

Me encontré con un investigador preocupado por el tema, el cual me manifestó: "Si las cifras no fueron discutidas..." Otro dijo: "Supongo que cuando se llega al nivel ministerial se cuenta con la infraestructura necesaria para revisar cifras y datos". Recordé la tremenda computadora a la cual tenía acceso el Ministerio y me preocupé por mis cifras; volví a sumarlas entonces, y coincidieron con las anteriores. Hasta aquí solamente podemos probar que según mi metodología (sujeta por supuesto a innumerables errores) el ámbito de la Universidad Nacional de La Plata no era representativo del "todo".

Recordé mis épocas de trabajo en los Estados Unidos de Norteamérica, en Holanda y en Bélgica, lo que conocí de Suecia, y las frías cifras adelantadas por el Ministro no coincidían con la impresión que yo poseía. Me critiqué a mí mismo por considerar "impresiones" —eso no era científico—. Debía manejar productos brutos, dólares por habitante, debía considerar que las inversiones en nuestro país se hacían en pesos y por lo tanto, según fuese la cotización del dólar variaría la cifra en esa divisa. Era demasiado: debía dejar mi labor específica. No obstante eso, encontré algunos datos del "todo", aunque solamente de años cercanos: Holanda invirtió en 1977 el 2.1 % del Producto Bruto Interno en Ciencia y Técnica, lo cual constituye 129 dólares por habitante; Suecia en 1976, 1.7 % del P.B.I., lo que arroja 158 dólares por habitante; EE.UU. 2.2 % del P.B.I., 174 dólares por habitante, y Argentina en 1976, 0.3 % del P.B.I., lo que constituye 2.5 dólares por habitante (UNESCO, documentos 42 y 43).

El "todo" tampoco coincidía con el Ministro...

H. E. Cingolani
Universidad Nacional de La Plata

Sobre las cartas del lector

En *Medicina (Bs Aires)* y en la *Revista Argentina de Cardiología*, han aparecido trabajos de Milei y col, sobre la patología del infarto agudo de miocardio, siendo el fenómeno trombótico-coronario reciente, uno de los fenómenos analizados (*Rev Argent Cardiol* 44: 19, 1976; *Medicina (Bs Aires)* 40: 302, 1980). Motivadas, al menos parcialmente, por diferencias de opinión entre ellos y otros investigadores, han visto la luz también varias cartas, en las que se reiteran criterios y proveen datos adicionales (Sundblad, *Medicina*

(Bs Aires) 40: 620, 1980; Milei y col., *Medicina* (*Bs Aires*) 41: 120, 1981; Sundblad, *Medicina (Bs Aires)* 41: 122, 1981.

Un escrito nuestro (Bastaroli, Vázquez y Norymberg) fue aceptado y puesto en la sección Adelantos; *Medicina (Bs Aires)* 34: 64, 1974. En base a nociones de la literatura y a elaboración propia se propusieron algunas conclusiones concernientes a la existencia o no de coágulo oclusivo precediendo al infarto. Con respecto al texto —cuya lectura es sugerida por Sundblad—, Milei, Bolomo y Vázquez dicen: "Entre las revisiones que (Sundblad) recomienda..., señala a la de Bastaroli y Vázquez (*Medicina* (*Bs Aires*) 34: 64, 1973) (no es 1973, sino 1974)... Luego de siete años, el Dr. A. Vázquez señala, como co-autor de nuestro trabajo, el carácter secundario de la TC (trombosis coronaria). Esperamos que en mucho menos tiempo el Dr. Sundblad comparta nuestras conclusiones..." (*Medicina (Bs Aires)* 41: 120, 1981). Dado lo que se afirma en cuanto al Dr. Vázquez, cabe deducir que el resto de los responsables (por ejemplo yo, primer firmante), no ha alcanzado todavía, quizás, la posición justa en torno a la cuestión aludida. Así que unos años después vuelvo a referirme a esta cuestión. El trombo primitivo no es obligatorio; tampoco la obstrucción orgánica crónica es indispensable; el trombo, no obstante, posee la facultad de causar infarto; asimismo, en oportunidades, se instala pasada la necrosis e incluso más tarde, sucedido el fallecimiento eventual. Creo que éstas son verdades indiscutidas, e importantes, aunque todos aspiren a una mejor definición cuantitativa de los hechos. DeWood y col. (*N Engl J Med* 303: 897, 1980) buscan el trombo angiográficamente y lo extraen con catéter de Fogarty durante la cirugía. El coágulo, en las horas iniciales, es observado con extrema frecuencia; menos, en el período siguiente; y no se olvida la influencia del espasmo arterial.

Más, no me toca aventurar; pero, habiendo sido involucrado, sí desearía insistir acerca del estilo de la correspondencia y, en general de lo que se lleva al papel para una revista de ciencias, especialmente médicas. Precisamente una carta del Dr. Goñi (*Medicina (Bs Aires)* 41: 123, 1981) me sirve de guía. Una posterior, del Dr. Roncoroni (*Medicina (Bs Aires)* 41: 395, 1981), a su vez propugna una conducta distinta. Esta responde, a mi entender, a una idea tan novedosa, como es de original el pensamiento del Dr. Roncoroni. Transcribo fragmentos: "No creo inconveniente que se exteriorice cierta pasión en la polémica acerca de lo que uno u otro cree... Además, y creo que esto es más importante, en nuestro país las mayores pasiones se vinculan hoy a la economía, la política o a los espectáculos deportivos. El hecho de que algunos conserven aún fuerzas para apasionarse en torno a discrepancias científicas no debería ser motivo de crítica por los partidarios de un lenguaje aséptico, a través del cual se disimulen las emociones." Coincido plenamente, pues pasión (además de padecimiento, sufrimiento) es vehemencia, ardor, calor, entusiasmo. Estos constituyen ingredientes eficaces para la vida y labor del que estudia, enseña, publica y persigue descubrir los secretos de la realidad; y por añadidura, están ahí, forman parte, identifican al ser humano separándolo del robot. Pero, fuera de que profundizando ligeramente o algo más (la pasión es el caballo negro en el mito platónico del carro alado) a nadie escapan las connotaciones negativas del término, no pienso que resulte bueno, en el momento de la discrepancia y esclarecimiento científicos, encontrar a las emociones que mencionó, habituales en determinados terrenos. Expresado directamente, no son admisibles ni en pequeña proporción la ironía, la sorna, la desconsideración, e incluso la paradoja y el despliegue literario gratuito. La pasión ha de manifestarse en modo diverso, y adecuado, reflejando optimismo, convicción, y mediante elocuencia, objetividad, y con respeto.

En *Medicina*, en el mismo número donde ha salido la carta del Dr. Roncoroni, hay un artículo especial a propósito de la enfermedad cardíaca de Mahler. El tema es desarrollado por quien seguramente siente muy hondo la música, conoce bien a los compositores e intérpretes, y transmite magistralmente sus impresiones. Y el relato es sumamente triste. Destaco estos renglores: "Como quiera que sea, Mahler cumple obedientemente con el pronóstico de sus médicos, falleciendo de una enfermedad cardíaca en mayo de 1911". Como lector, pregunto: ¿seriamente, el autor sostiene que es un caso de cumplimiento y obediencia? Es más probable que se trate de aquella paradoja gratuita, del giro ingenioso pero sin atingencia de fondo con el verdadero mensaje, de las palabras que tanto cuesta borrar cuando nos acomete la tentación de ponerlas, y cuando la pasión, la pasión por la objetividad, no vigila suficientemente.

J. C. Bastaroli

Instituto de Investigaciones Médicas

Reflexiones sobre hechos coincidentes

Hasta no hace mucho tiempo era un lector más de *Medicina*, revista para la cual tuve alguna vez la satisfacción de colaborar con una actualización. Sin embargo, los motivos que me indujeron a escribir estas líneas no guardan relación con lo anterior, ya que éstos son ciertos hechos coincidentes que comenzaron con la aparición de un comentario bibliográfico (*Medicina (Bs Aires)* 39: 699, 1979) sobre un libro de 42 capítulos, al cual yo contribuí con dos. Obviamente nada de esto sería llamativo si no fuera por haberse dedicado un tercio del artículo para hacer una furibunda crítica a lo escrito por mí, que tan sólo representaba una pequeña parte del total y que no se diferenciaba mayormente del nivel medio de la obra. Por supuesto, cabe pensar que ello se debió al producto de la casualidad, es decir, que el libro haya sido repartido entre varios especialistas para su evaluación bibliográfica y que justo el endocrinólogo haya sido el más severo y puntilloso del grupo. De cualquier manera, no es mi interés ahondar en el problema ya que tuve la oportunidad de puntualizar mi parecer en la carta enviada al comité de redacción por los editores del libro (*Medicina (Bs Aires)* 40: 490, 1980). Pero

otra vez la diosa fortuna no estuvo de mi parte, ya que si bien pude mejorar mi posición al responder a las críticas recibidas, dos páginas después de nuestra carta aparecía otra (*Medicina (Bs Aires)* 40: 492, 1980) en la que el Dr. González Cueto denostaba vehementemente un reciente trabajo nuestro (*Medicina (Bs Aires)* 40: 11, 1980). Mucho lamentamos que no se nos hubiese hecho conocer la carta del Dr. González Cueto antes de su publicación, para darnos la oportunidad de argüir contra sus términos y permitir que ambas cartas apareciesen simultáneamente, como se estila en otras revistas internacionales que mantienen una sección de cartas al editor. Más aún, fuimos advertidos de que no podíamos tener acceso a la lectura de dicha carta hasta que ésta apareciese publicada en *Medicina*. Por supuesto que nosotros acatamos esa tesitura y luego de ver la carta nos pusimos en campaña para preparar nuestra réplica, cosa que hicimos a la brevedad. Nuevamente la sorpresa nos invadió, ya que pasaban los números de *Medicina* y la carta no se publicaba, hasta que por fin (5 números después), y cuando ya casi todos habíamos olvidado el asunto por el largo tiempo transcurrido, vimos con honda emoción que nuestra carta finalmente aparecía en el índice de *Medicina (Bs Aires)*, Vol. 41, Nº 3. Pero... otra vez la frustración. Al parecer *Medicina* había cambiado su tesitura y adoptado el buen criterio de las revistas internacionales que publican simultáneamente las cartas del crítico y del criticado. Así, observamos cómo al Dr. González Cueto se le hizo llegar nuestra carta con anticipación para que preparase su respuesta, postergando la nuestra hasta que ambas se publicaron juntas. Obviamente que al Dr. González Cueto se le hizo realidad ese dicho tan común del que "pega primero pega dos veces".

Por supuesto que no creo que esta asociación de hechos sea otra cosa que mera coincidencia. Sin embargo, debo admitir que al pensar en los mismos, y aún contra mi voluntad, recordé esa frase popular que dice: "no creo en las brujas, pero que las hay, las hay".

Hugo Niepomniszcze

Nota: El Comité de Redacción decidió que a partir del tomo 41, las cartas que aludieron a trabajos publicados en la revista fueran previamente giradas a los autores respectivos y publicadas luego simultáneamente con la respuesta.

— — — —

There are two kinds of reality or existence: the existence of my consciousness and the reality or existence of everything else. The latter reality is not absolute but only relative. Excepting immediate sensations, the content of my consciousness, everything is a construct; but some constructs are closer, some further, from the direct sensation.

Hay dos clases de realidad o existencia: la existencia de mi consciencia y la realidad o existencia de todo lo demás. Esta última realidad no es absoluta pero sólo relativa. Excepto las sensaciones inmediatas, o sea el contenido de mi consciencia, todo el resto son "elaboraciones"; pero algunas son más cercanas, otras más lejanas, de las sensaciones directas.

E. P. Wigner

Two kinds of reality, 1964
(citado por J. E. Eccles: *The human mystery*, Springer, 1979)

COMENTARIOS BIBLIOGRAFICOS

Proceeding of the Fifth International Conference on the Mycoses. Superficial and subcutaneous infections. Caracas, Venezuela. 27-30 April. Scientific Publication nº 396. Pan American Health Organization. Washington, 1980, 390 pp. u$s 15.

Se trata de la publicación completa de los trabajos presentados en la Vª Conferencia Internacional sobre Micosis. Resulta virtualmente imposible juzgarla como un libro, ya que en realidad está compuesta por un conjunto de trabajos científicos con valores y características muy diversas. Son considerados estudios clínicos, epidemiológicos, taxonómicos, micológicos, inmunológicos y terapéuticos sobre las micosis superficiales y subcutáneas.

Este libro está dividido en seis partes. La primera incluye la conferencia inaugural sobre los Dermatofitos y las enfermedades que producen, a cargo del Dr. Pereiro Miguens. La segunda parte comprende trabajos sobre pitiriasis versicolor, piedra negra, queratomicosis, tricomicosis y dermatofilosis. La tercera sesión abarca estudios taxonómicos y técnicas para la clasificación de los Dermatofitos, junto a investigaciones epidemiológicas y organización de laboratorios de referencia para el diagnóstico, y la formación de los recursos humanos especializados. La cuarta parte está referida a las micosis subcutáneas donde se hace especial referencia a la taxonomía de los hongos dematiáceos, a la obtención de exoantígenos que permiten la diferenciación de micro organismos morfológicamente semejantes, y a la reproducción de la cromomicosis experimental en el ratón con lesiones iguales a las observadas en el hombre. Se publican, también, estudios epidemiológicos e inmunológicos de la esporotricosis y la obtención experimental de micetomas por *N. brasiliensis* en ratones. Por último, las dos sesiones finales están dedicadas a los tratamientos nuevos que comprenden la evaluación de las nuevas terapéuticas en pitiriasis versicolor, se analizan los resultados obtenidos en el tratamiento de la cromomicosis con las asociaciones de 5-fluorocitosina con la anfotericina B y el tiabendazol y, finalmente, se presentaron varios trabajos sobre el tratamiento de la paracoccidioidomicosis, la histoplasmosis y la coccidioidomicosis con ketoconazol por vía oral.

Podemos concluir que el lector encontrará en este volumen una información completa de las investigaciones llevadas a cabo en nuestro continente sobre este grupo de afecciones. La redacción es clara, con una correcta traducción de los trabajos escritos originalmente en castellano y las ilustraciones son muy buenas. Hay algunas novedades de interés, como el valor taxonómico de la obtención de exoantígenos para la clasificación de los hongos dematiáceos y los Dermatofitos, los estudios sobre patogenia e hipersensibilidad en las pitirosporosis, la descripción de especies nuevas de Dermatofitos, la obtención de un modelo de cromomicosis experimental que facilitará los ensayos terapéuticos y los tratamientos más modernos de las micosis superficiales y subcutáneas.

Quantitative aspects of risk assessment in chemical carcinogenesis. Archives of Toxicology, nº 3. Springer-Verlag, Berlin, 1979 pp.

La primera parte de este Simposio está dedicada a estudios epidemiológicos y su rol en la evaluación del riesgo en el hombre. Aparece claramente que la epidemiología, tal como es practicada corrientemente, no puede tener un papel central en la evaluación del riesgo porque muchos factores ambientales pueden modificar los resultados. Sirve, sin embargo, para establecer un sistema de monitoreo capaz de detectar efectos carcinógenos no esperados y como sistema de vigilancia para detectar riesgos conocidos. Los varios autores pasan en revisión la posible acción carcinogenética de la aflatoxina, fenobarbitona e isoniazida, que son carcinógenos en los animales. A pesar de que es más fácil evaluar el riesgo carcinogenético de sustancias medicamentosas o relacionadas con determinadas ocupaciones, debe tenerse en cuenta la importancia que tienen las sustancias que se encuentran naturalmente en el ambiente, ampliamente dispersas en la naturaleza, y que pueden estar a disposición de la población por largo tiempo como, por ejemplo, la aflatoxina, cuya evidencia de hepatocarcinogenicidad fue abrumadora para muchas especies, inclusive los monos.

Respecto de los medicamentos, se observó exceso de tumores de vejiga con la chlornafazina (similar a la 2-naftilamina), mientras que la evidencia del poder carcinogenético de la feno-

barbitona se basa, en realidad, solamente en el estudio realizado sobre 900 roedores. En cuanto a la isoniazida, a pesar de que la mortandad por tumor aumentó en los tuberculosos tratados con esta droga, no se pudo establecer una relación de causa a efecto.

En los tumores inducidos por radiaciones, cuando hay evidencia de exposición bien documentada, el análisis epidemiológico permite establecer reglas estandarizadas de seguridad; pero con dosis bajas y continuas es menos fácil establecer este tipo de límites. Los autores establecen una fórmula para determinar el coeficiente de riesgo. La mayor experiencia sobre acción de los rayos se obtuvo, para distintos tipos de cáncer, con el estudio de los sobrevivientes de Hiroshima y Nagasaki, y con la observación de los mineros de las minas de uranio, por los cuales fue necesario establecer un WLM *(Working Level Month)*, nivel mínimo de exposición en el trabajo por mes.

La segunda parte del libro estudia el mecanismo íntimo carcinogenético de varias sustancias como las nitrosaminas y el cloruro y bromuro de vinilo. Por lo general, varios autores, entre otros el Dr. Reitz, insisten en el concepto de que los carcinógenos pueden ser divididos en carcinógenos genotóxicos y no genotóxicos o no genéticos, llamados también carcinógenos epigenéticos.

Todos los carcinógenos de tipo genotóxico son electrófilos y provocan lesiones al DNA a las que, a veces, sigue su reparación, que puede, a veces, resultar en una reparación errónea (por ej., en el caso de las nitrosaminas se describe la formación de una 0^6 alquilguanina). El cáncer en el tipo de cancerización genotóxica es de origen clonal, porque se trata de una mutación que puede nacer de la modificación en un solo par de bases. En este caso no hay dosis umbral porque la dosis de carcinógeno genotóxico para inducir el cáncer debe ser extremadamente pequeña. En los casos de carcinógenos de tipo epigenético, nos movemos en el área similar a cualquier sustancia tóxica cuyo nivel aceptable puede ser fijado según las reglas clásicas.

En la tercera parte del libro se vuelve a insistir sobre el escaso conocimiento que tenemos respecto de los sitios topológicos de la interacción dentro del material genético. En muchos casos conocemos a cuáles átomos, en una base, está ligado el carcinógeno, pero no sabemos dónde se hace la unión en el cromosoma, si ésta es uniforme o si es preferencial en algunos sitios, y si hay otros niveles adicionales de control. Analizando la diferente respuesta a carcinógenos, según las especies, varios autores encuentran que la reparación del DNA no siempre provee la explicación completa para analizar la ausencia de una relación entre la lesión química primaria y la sensibilidad propia de determinadas especies: hay que tener en cuenta no solamente el aspecto cuantitativo del proceso de reparación, sino también la fidelidad del proceso, es decir, si este proceso refleja una reparación con o sin error. Con respecto a los factores que dependen del huésped y controlan la magnitud de la interacción primaria con el DNA, se insiste sobre la especificidad y multiplicidad de las enzimas activadoras e inactivadoras de los distintos tejidos en cada especie.

Una importante contribución de tipo morfológico ha sido hecha por el Dr. Bannasch, quien describió los múltiples estadíos que llevan al cáncer de hígado luego de los efectos citotóxicos y de los cambios preneoplásicos. En el caso de la necrosis citotóxica hepática que precede al estadío preneoplásico, el daño nace de la interacción del metabolito activo con las proteínas más que con el ácido nucleico y, según el Dr. Yollow, el daño depende, además, en gran parte, del nivel celular del glutation. Pero el nivel de glutation hepático parece tener poca influencia en la unión de los metabolitos del cloruro de vinilo.

En la cuarta parte, el Dr. Bridges pasa en reseña los tests de mutagenicidad y de sus limitaciones, especialmente del test de *Salmonella.* Tales tests se basan sobre la capacidad de una sustancia de producir un daño al ADN que lleva a mutaciones y a transformación maligna. Pero hay que tener en cuenta que hay tipos de carcinógenos que, como los asbestos y las hormonas, no producen este daño.

Los tests de carcinogenicidad en organismos inferiores no nos dan una indicación cuantitativa del nivel del riesgo en el hombre a causa de las complejas capacidades metabólicas del organismo humano que pueden estimular o disminuir el efecto mutagénico de un agente o, simplemente, porque el cáncer es una enfermedad de los animales y no de los microorganismos. Alrededor del 57 % de los carcinógenos humanos presentan en el hombre el mismo órgano blanco que en los animales y el 65 % de las 100 sustancias químicas carcinogenéticas en rata y ratón presentan el mismo órgano blanco en las 2 especies. El mejor método para extrapolar es el de conocer a fondo el mecanismo de acción, el metabolismo de las sustancias químicas y cómo ellas interactúan con el receptor celular.

Esta obra cubre con profundidad un amplio espectro de aspectos epidemiológicos, por un lado, y de mecanismo de cancerización, por el otro. El tema es muy complejo teniendo en cuenta que el camino metabólico intermedio de los carcinógenos es distinto para cada sustancia en juego. Se discute, también, la forma de establecer el umbral mínimo de riesgo para el hombre en base a los datos epidemiológicos y experimentales. Por la forma en que está encarado el Simposio, y por las detalladas discusiones que aportan nuevos elementos de interés, se puede considerar que se trata de un libro de indudable valor didáctico, recomendable como obra de consulta para los oncólogos básicos y para los toxicólogos pero, debido a la complejidad con que están encarados algunos temas básicos, sólo los oncólogos que están especializados en el tema del mecanismo químico de la carcinogénesis podrán aprovecharlo en su totalidad. Puede objetarse, además, que, por su característica de Simposio, algunos tópicos a veces se sobreponen o son discutidos por varios

Aerobic gram-negative bronchopneumonias. P. P. Thys, J. Klastersky, E. Yourassowsky (eds), Pergamon Press, New York, 1980, 183 pp.

autores desde un punto de vista diferente, lo que puede confundir al lector.

Este pequeño libro resume en 8 capítulos el simposio del título, realizado en Bruselas en 1980. La importancia del tema se infiere fácilmente conociendo que por lo menos la mitad de las bronconeumonías observadas en pacientes hospitalizados se deben a bacilos gram negativos aeróbicos (BGNA). En el primer capítulo se establece la importancia de la colonización de la orofaringe por BGNA. Ella depende de que la aspiración bronquial de contenido faríngeo es la causa más habitual de infección pulmonar cuando existe algún trastorno en la depuración bacteriana normal del pulmón. Se afirma que la presencia de anticuerpos circulantes contra los gérmenes colonizantes no es evidencia de infección, concepto que encontrará seguramente oposición entre los muchos que investigan justamente su presencia para decidir tratamiento. Otro punto de posible discrepancia es la técnica de preincubación en caldo, antes del uso de placas con medios selectivos, de la flora orofaríngea de normales como método más sensible para encontrar BGNA que podrían existir en hasta 18 % de esos sujetos contra el hallazgo de no más de la mitad de este número por la técnica de cultivo en placa inicial. Es muy probable que desde el punto de vista clínico este hecho no sea significativo dado el escaso número de bacilos así hallados.

El capítulo de infecciones hospitalarias asociadas al uso de respiradores y humidificadores confirma conocimientos bien definidos [*Medicina (Bs Aires)* 34: 170, 1974] respecto a la infección de pacientes en estado crítico por respiradores, nebulizadores, etc., o las manos de portadores médicos o enfermeras. En el capítulo dedicado al diagnóstico bacteriológico se aborda el problema de la representatividad de los gérmenes hallados y la posibilidad de que el hallazgo de células epiteliales en la punción traqueal (PT) no sea índice de dirección inadecuada del catéter sino también de fallo en la depuración bronquial de células y gérmenes. La presencia de BGNA "adheridos" a las células epiteliales es tomada como índice de contaminación salivar. Por otro lado, la PT sin células epiteliales pero mostrando BGNA en un paciente en tratamiento con respiradores o humidificadores o con enfermedad pulmonar crónica, es decisiva para el diagnóstico de infección pulmonar primaria por BGN. Por otra parte, los pacientes con PT mostrando BGNA tuvieron una mortalidad de 40 % independientemente de la presencia de contaminación salivar. Se destacan la variable incidencia de *Klebsiella* o *Pseudomonas* según los hospitales y la época del estudio y el hecho de que estas 2 especies son responsables de más de la mitad de las neumopatías agudas hospitalarias a BGNA. Se describe el hecho coincidente con la experiencia general que el cuadro clínico-radiológico no es suficiente para el diagnóstico preciso, y que sólo el estudio bacteriológico permite el diagnóstico del germen.

La contribución del huésped es considerada determinante para la infección pulmonar por gérmenes que son comensales comunes presentes como flora endógena tanto en normales como enfermos. Se dice también que esta infección no es comunicable, sin embargo es bien sabido que el personal trasporta en sus manos los gérmenes a otros pacientes y son bien conocidas la contaminación de respiradores, etc. Tampoco es endógena la *Klebsiella* o la *Pseudomona.*

Se reconocen 5 síndromes clínicos de neumopatía por BGNA: 1) aguda lobar o neumonía de Friedlander; 2) primaria a BGNA; 3) nosocomial; 4) asociada con nebulizaciones a partir de un recipiente, y 5) en cancerosos. Una afirmación discutible es la de que los antibióticos profilácticos no aumentan la colonización con BGNA sino que el efecto adverso se debe a la selección de especies resistentes. Sin embargo, se sabe que la supresión de la flora normal favorece la colonización (Petersdorf, 1957; Sprunts y Redman, 1968). Se señala que sólo el 26 % de los pacientes con infecciones pulmonares por BGNA respondieron al uso sistémico de aminoglucósidos a pesar de la adecuada susceptibilidad in vitro. Los factores serían el bajo índice terapéutico, la escasa penetración en la secreción bronquial y la inactivación en el material purulento. Por el contrario, el suministro local de antibióticos por nebulización o instilación resultó en muy elevadas concentraciones con persistencia así como buena actividad terapéutica. El inconveniente principal es la emergencia de cepas resistentes.

Se discuten las posibles ventajas del uso de anticuerpos contra antígeno 0, capsular, lipopolisacárido y la exotoxina del B. piociánico. En pacientes inmuno-comprometidos la trasfusión de leucocitos e inmunización pasiva es sugerida como la mejor opción, dado que es improbable obtener respuesta adecuada de anticuerpos en el tiempo disponible. Un punto fundamental es que los pacientes con mucoviscidosis manifiestan una buena cantidad de anticuerpos humorales, pero un continuo deterioro pulmonar es lo que hace dudar de la utilidad de la inmunización.

Hace ya 7 años el presente comentarista publicó (*Medicina (Bs Aires)* 34: 170, 1974) un editorial describiendo los riesgos y responsabilidad del uso, hasta entonces generalizado, en nuestro medio, de antibióticos de amplio espectro en forma profiláctica en el desarrollo de infecciones hospitalarias por BGNA. Se señaló, también, la importancia de la limpieza minuciosa del medio ambiente alrededor del enfermo incluyendo ropas, manos del personal, respiradores, humidificadores, etc. Entonces, y mucho más ahora, la prevención de estas infecciones no es del resorte del médico sino más bien una decisión política instrumentada al más alto nivel administrativo. En efecto, en la medida que no se disponga del recurso humano adecuado, el control de este tipo de infecciones es ilusorio.

INDICE DE AUTORES

INDICE TEMATICO

Genética

Hematología

Hipertensión

Historia

Inmunología

INDICE DE COMENTARIOS BIBLIOGRAFICOS

XXVI REUNION CIENTIFICA DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

COMISION DIRECTIVA

AGRADECIMIENTOS

SUBSECRETARIO DE CIENCIA Y TECNICA (SUBCYT)
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET)
COLEGIO DE FARMACEUTICOS DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES
BANCO DE LA NACION ARGENTINA
AADEE
COASIN
INSTITUTO SIDUS S.A.
JULIO LEVIT S.A.
LABORATORIOS BAGO
LABORATORIOS GLAXO
LABORATORIOS MERCK SHARP & DOHME
LABORATORIOS MONTEDISON
LABORATORIOS ORGANON ARGENTINA S.A.
LABORATORIOS RODRIGUEZ CORSWANT S.R.L.
LABORATORIOS SEARLE
LABORATORIOS SQUIBB S.A.I.C.
MAB - INSTRUMENTAL S.R.L.
MERCK QUIMICA ARGENTINA S.A.I.C.
QUIMICA HOECHST
SCIENTIST S.R.L.

Zopirac

ZOMEPIRAC SINTYAL 120 mg

EL ANALGESICO SIN LIMITACIONES

POSOLOGIA
1 comprimido cada 6 horas.
En tratamientos prolongados las dosis se adoptarán según criterio médico. Resulta innecesario elevar las dosis por encima de los 720 mg diarios ya que las mismas no incrementan su actividad analgésica

COMPOSICION
Cada comprimido contiene 120 mg. de Zomepirac sódico dihidratado

PRESENTACION
Envases conteniendo 20 y 50 comp.

CONTRAINDICACIONES
Hipersensibilidad a la droga

Laboratorios SINTYAL
Carlos Berg 3669 - Bs. As.

MEDICINA agradece el apoyo publicitario brindado durante el año 1981 por las siguientes empresas:

ABBOTT	Pantomucol
ANDROMACO	Naprux - Flovacil
AKONIC	Equipos e Instrumental
BAGO	Trifaclox - Investigar es crecer
BAYER	Baycipen - Baymicina
BENTLEY SORIN	Marcapasos e Instrumental
BOEHRINGER ARGENTINA	Nitroprontan
BOEHRINGER INGELHEIM	Catapresan - Mexitilen - Asasantin
BURROUGHS WELLCOME	Productos de Investigación
CIBA–GEIGY	Dolo Tanderil - Voltaren Retard
Dr. GADOR	Streptozyme
ELI LILLY	Institucional
ESSEX ARGENTINA	Sisomina
GLAXO	Trandate
JOHNSON & JOHNSON ARGENTINA	Motilium - Stugeron Forte - Duflemina - Halopidol
JUAN C. GUZMAN	Ecocardiógrafos
LABINCA	Solutrat - Cirramina - Línea de Psicofármacos - Endoxan Asta
LEPETIT	Deltisona B
MEAD JOHNSON	Platinol - CeeNU - BiCNU
MERCK SHARP & DOHME	Aldomet
PARKE DAVIS	Institucional
PFIZER	Minipres - Feldene - Tibricol
POLYCHACO	HBs Hemo TEST
PROMECO	Nap - Sival
QUIMICA HOECHST	Karidium - Hostaginan Forte - Pretor
ROCHE	Institucional
RHODIA	Institucional
SIDUS	Inter A 11 - Nifelat
SINTYAL	Zopirac
SQUIBB	Velocef

CUANDO LE SOLICITEN UNA PRUEBA ASO ASEGURE EL DIAGNOSTICO CON STREPTOZYME®

Mientras que los ensayos convencionales detectan solo ASO, STREPTOZYME detecta además de ASO otros anticuerpos* a exoenzimas indicadores de una infección a estreptococos.

STREPTOZYME permite detectar a más pacientes con anticuerpos a estreptococos que efectuando las determinaciones con las pruebas ASO solamente. Vale el ejemplo de un estudio en el cual de 76 pacientes con infección estreptocócica confirmada, STREPTOZYME detectó el 95% mientras que con ASO solo el 60%. [1]

En presencia de un cuadro clínico compatible, una prueba STREPTOZYME, positiva, ayuda a confirmar el diagnóstico de fiebre reumática o glomerulonefritis aguda post-estreptocócicas. Debido a que STREPTOZYME detecta múltiples anticuerpos a exoenzimas incluyendo a ASO, *LOS TITULOS SE EXPRESAN EN UNIDADES STZ Y NO EN UNIDADES TODD.*

PARA BUSQUEDA

STREPTOZYME es ideal debido a que detecta a más pacientes en riesgo y a menudo anticipadamente en el curso de la enfermedad que utilizando solamente pruebas ASO. [2]

PARA CELERIDAD Y CONVENIENCIA

Mientras que las pruebas convencionales ASO se realizan en aproximadamente 2 horas, STREPTOZYME es una prueba en placa, simple en su realización, con facilidad en la visualización del punto final, en exactamente **2 minutos.**

PARA TITULACION

La simplicidad de la prueba STREPTOZYME facilita la tarea de titulaciones seriadas.

* AH, ASK, ADNasa, ANADasa. (anti: hialuronidasa, estreptoquinasa, desoxirribonucleasa, nicotinamida adenina dinucleotidasa).

Referencias:

(1) Bisno AL, Ofek I: Am. J. Dis. Child 127:681 - (Mayo) 1974.

(2) Bergner - Rabinowitz S, Fleiderman S, Ferne M. y col.: Clin. Pediatr. 14:804-809, (Sept.) 1975.

Para información dirigirse a:

Gador
DIVISION DIAGNOSTICOS

Laboratorios Dr. Gador y Cía. S.A.C.I.
Florida 868 - 1005 Buenos Aires
T.E.: 32-6333/5 y 32-8481/5

e* 20 mg
(piroxicam)

COMODO:

Una cápsula diaria de Feldene* 20 mg, asegura la colaboración del paciente y la continuidad del tratamiento.

SEGURO:

EFICAZ: Feldene* 20 mg antireumático efectivo en afecciones crónicas y agudas.[1]

BIEN TOLERADO: Menor capacidad ulcerogénica que otras formas de piroxicam.[2] Por su excelente tolerancia Feldene* 20 mg es mejor aceptado por pacientes tratados anteriormente con otros agentes.[3]

BIBLIOGRAFIA:

1.- Shoog, M.: Datos en archivo
2.- Pitts, N.E. y cols.: Efficacy and safety of piroxicam. Int. Cong. and Simposyum Series, Pfizer Central research, San Francisco, California, june 30, 1977, pag. 97.
3.- Dessain, P. Estabrooks y cols.

PRECIO AL PUBLICO INCLUIDO I.V.A. 1/7/81
FELDENE 10 mg x 20 cáp. $ 75.162
FELDENE 10 mg x 50 cáp. $ 178.690
FELDENE 20 mg x 20 cáp. $ 164.328

* Marca de PFIZER Inc.

MEDICINA (BUENOS AIRES)

FUNDADA EN 1939

ORGANO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA

REVISTA BIMESTRAL

(Registro de la Propiedad Intelectual Nº 87.075)

Publicada con el apoyo del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

MEDICINA no tiene propósitos comerciales. El objeto de su creación ha sido propender al adelanto de la medicina argentina. Los beneficios que pudieran obtenerse serán aplicados exclusivamente a este fin

Aparece en Current Contents, Biological Abstracts, Index Medicus y Excerpta Médica

---

REGLAMENTO DE PUBLICACIONES

MEDICINA *publica trabajos de medicina clínica o experimental, entendiéndose este término en el más amplio sentido de la palabra. Los artículos a publicarse deberán ser originales e inéditos aunque serán también aceptados aquellos que hubieran sido comunicados en sociedades científicas o publicados en forma de «resúmenes». En caso de haber sido presentado a la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, corresponderá mencionarlo citando la fecha de la reunión.*

La redacción se reserva, además, el derecho de introducir —con el conocimiento de los autores— todos los cambios editoriales exigidos por las necesidades tipográficas, la compaginación, el reglamento de publicaciones o por razones económicas.

Casuísticas, Adelantos en Medicina, Artículos Especiales y *Cartas al Comité de Redacción* serán publicados en castellano. Los *Artículos Originales* podrán redactarse en castellano o en inglés indistintamente. Los manuscritos deberán ser escritos a máquina, a doble espacio, y enviados por duplicado.

Las *historias clínicas* serán expuestas sintéticamente. Protocolos, registros, etc., sólo se reproducirán si ilustran significativamente el texto.

Las *tablas*, presentadas en hojas individuales, deberán estar numeradas, ser indispensables y comprensibles por sí mismas, y poseer un título claramente explicativo de su contenido. Sólo se permitirá una superficie total de tablas equivalente a una página de la Revista: todo excedente estará a cargo del autor.

Las *figuras* comprendiendo ilustraciones de cualquier naturaleza (radiografías, fotografías, registros, etc.), se presentarán numeradas correlativamente. En su parte posterior llevarán una inscripción a lápiz que permita identificarlas. Cada figura tendrá una leyenda explicativa. Debe evitarse la superposición de tablas y figuras.

La *bibliografía*, presentada en hoja aparte, deberá limitarse a aquellos artículos directamente relacionados con el trabajo mismo, evitándose las revisiones bibliográficas extensas que sólo serán aceptables en la sección *Adelantos en Medicina*. Las referencias se presentarán numeradas, en orden alfabético de autores *con los títulos de las publicaciones*. Los nombres de la revista figurarán en forma abreviada según el Index Medicus (ej.: J. Clin. Pathol. 19: 391, 1960). Los libros deberán figurar con su título, editor, ciudad y año de aparición.

Resumen: El trabajo deberá presentar un resumen de unas 200 palabras. *Además, contendrá un resumen más explicativo (de hasta 700 palabras) en inglés, con su título completo y con referencias a las figuras y tablas.*

Con motivo del constante aumento de los costos de edición, la Revista se hará cargo solamente de la impresión de 4 páginas (incluyendo tablas y figuras) para cada artículo original. Los autores deberán abonar los gastos que demande la mayor extensión de sus trabajos. El Comité de Redacción se reserva el derecho de solventar totalmente aquellos artículos de investigación clínica que considere de especial interés.

Se ruega enviar dirección postal y número de teléfono particular para facilitar el envío de pruebas de galera.

Secretaría y Redacción (de 8.30 a 17 hs.): Ana G. de Delisio, Instituto de Investigaciones Médicas, Donato Alvarez 3150, 1427 Buenos Aires. T. E. 52-0061/64.

Suscripción	Argentina	$	200.000
	Con cobrador a domicilio	$	220.000
	Números sueltos	$	45.000
	Extranjero	u$s	35

Correo Argentino	Central "B"	Franqueo pagado Concesión Nº 856
		Tarifa reducida Concesión Nº 666

Publicidad: Dr. Horacio J. Delisio, T. E. 52-0061/64
Sra. Nélida B. de Pecoraro

Las suscripciones corresponden de enero a diciembre de cada año. Los pagos se podrán hacer personalmente o por correo con cheque o giros a la orden de Fundación Revista Medicina.

Impreso en ZLOTOPIORO S.A.C.I.F., Sarmiento 3149 - Bs. Aires, Argentina

Nuevo tratamiento de la hipertensión arterial leve y moderada

NAP-SIVAL®

Ca^{++}

Antihipertensor
Regulador iónico de la pared arterial.
1 gragea por día.
Envases con 10 y 30 grageas.

Bajo fórmula de
Les Laboratoires Servier
Francia.

analgésico de alto poder

FLOVACIL®

mayor potencia analgésica
efecto más duradero
mejor tolerancia
un resultado redondo

Indicaciones: *Tratamiento del dolor: osteoartritis, dolores postoperatorios, afecciones reumáticas, odontalgias, dolores postraumáticos, etc.*

Fórmula: *Cada comprimido recubierto contiene: Acido 2', 4' -difluoro-4-hidroxi-3-difenil-carboxílico (DIFLUNISAL) 500 mg.*

Posología y Forma de administración: *Como dosis usual se aconseja administrar 1 comprimido por la mañana y 1 comprimido por la noche. (Salvo indicación facultativa).*

Presentación: *Envases originales de 10 y 40 comprimidos recubiertos.*

Precio al público con IVA al 15-7-81
x 10 comprimidos $ 20.151
x 40 comprimidos $ 74.937

Acciones colaterales y secundarias: *Pueden presentarse síntomas relacionados con el aparato digestivo: epigastralgia, náuseas y vómitos. En raras ocasiones fueron relatadas erupciones cutáneas, hemorragia gastrointestinal y úlcera péptica.*

Precauciones y Advertencias: *La administración simultánea de anticoagulantes puede llevar a una sobredosificación relativa de los mismos debido a la alta afinidad de FLOVACIL por las proteínas plasmáticas. Debe evaluarse individualmente su administración en pacientes con insuficiencia renal.*

Contraindicaciones: *No debe utilizarse en pacientes con hipersensibilidad al fármaco; asmáticos con antecedentes de crisis desencadenadas por ácido acetilsalicílico u otros antiinflamatorios no esteroides; úlcera péptica en actividad y durante la lactancia. No se aconseja su utilización en pacientes embarazadas, especialmente durante el primer trimestre de la gestación.*

Andrómaco

FLV-11-A.1

EN INFECCIONES URINARIAS

SISOMINA I.M.

100 mg

DOSIS DIARIA UNICA INYECTABLE

Posología diaria única - infecciones urinarias

Pacientes con función renal normal

SISOMINA		DOSIS DIARIA
100 mg.	Adultos de más de 60 kg.	Una ampolla I.M.
75 mg.	Adultos de 60 Kg o menos	Una ampolla I.M.

DURACION DE LA TERAPIA: Duración usual de la terapia en todas las infecciones es de 7-10 días.

Información para recetar

SISOMINA INYECTABLE—Dosificación diaria única para Infecciones Urinarias.

Indicaciones: Infecciones urinarias causadas por gérmenes sensibles, incluyendo especies de Estafilococo (aún cepas resistentes a la meticilina), Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella-Enterobacter-Serratia, Proteus (indol positivo e indol negativo) y Citrobacter. Se ha demostrado eficacia clínica aún contra cepas resistentes a otros antibióticos.

Contraindicaciones: Pacientes con antecedentes de hipersensibilidad a la Sisomina Inyectable y aquellos con cualquier grado de insuficiencia renal.

Precauciones: Debe evitarse la administración concomitante de Sisomina Inyectable con diuréticos potentes, agentes bloqueadores neuromusculares y otras drogas conocidas por su toxicidad renal o neurotóxica.

Dosificación: La Sisomina puede administrarse por vía I.M. en una dosis diaria única por 7-10 días a pacientes adultos con función renal normal. Para adultos que pesan más de 60 kg., la dosis diaria única de Sisomina es una ampolla de 100 mg. Para adultos que pesan 60 kg., o menos la dosis diaria única de Sisomina es de una ampolla de 75 mg.

Este resumen contiene solamente información básica para recetar. Información más completa es disponible a solicitud de los señores médicos.

Referencias

1. Stone, H. H. et al.: Ann. Surg. 183:660 (June), 1976.
2. Medical Research Files, Schering Corporation, U.S.A.
3. Madsen, P. O.: Efficacy and Tolerance Study of Sisomicin in Urinary Tract Infections: Comparison on Once Daily and Twice Daily Adminisitration. Presented at 9th Int. Cong. Chemotherapy. London 1975.
4. Dale & Cox. C.: Efficacy and Tolerance Study of Sisomicin in Urinary Tract Infections: Comparison on Once Daily and Twice Daily Administration. Presented at 9th Int. Cong. Chemotherapy. London 1975.
5. Thompson, I.: Efficacy and Tolerance Study of Sisomicin in Urinary Tract Infections: Comparison of Once Daily and Twice Daily Administration. (En imprenta.)

ESSEX (ARGENTINA) S.A.I.C.
con licencia de
SCHERING CORPORATION U.S.A.
Kenilworth, New Jersey

MARCA DE FABRICA

Stugeron

JANSSEN

Antiespasmógeno vascular y sedante laberíntico.

forte

2 comprimidos por día

Permite una mayor continuidad y consecuentemente una mejor respuesta clínica en el tratamiento de la patología vascular.

Producido bajo licencia de
JANSSEN PHARMACEUTICA n.v.
Beerse, Belgica

Precio de Venta al Publico al 21-4-81

Envase de 30 comprimidos: $ 32.568.-
Envase de 60 comprimidos: $ 62.624.-
Envase de 100 comprimidos: $ 91.158.-

Elaborado por
Johnson & Johnson
de Argentina S.A. Comercial e Industrial
Darwin 471 - Buenos Aires